Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale,, n. 43 del 20 febbraio 2008 - Serie generale

Spediz. abb. post. 45% - art. 2, comma 20/b
Legge 23-12-1996, n. 662 - Filiale di Roma

GAZZETTA UFFICIALE
DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA **Roma - Mercoledì, 20 febbraio 2008** SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI NON FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DELLA GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA 70 - 00186 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA G. VERDI 10 - 00198 ROMA - CENTRALINO 06 85081

AVVISO AGLI ABBONATI

Si rammenta che la campagna per il rinnovo degli abbonamenti 2008 è terminata il 26 gennaio e che la sospensione degli invii agli abbonati, che entro tale data non abbiano corrisposto i relativi canoni, avrà effetto nelle prossime settimane.

N. 40

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE ALIMENTARI E FORESTALI

DECRETO 30 ottobre 2007.

Lotta obbligatoria contro *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Recepimento della direttiva della Commissione 2006/63/CE.

SOMMARIO

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE ALIMENTARI E FORESTALI

DECRETI, DELIBERE E ORDINANZE MINISTERIALI

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE ALIMENTARI E FORESTALI

DECRETO 30 ottobre 2007.

Lotta obbligatoria contro *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Recepimento della direttiva della Commissione 2006/63/CE.

IL MINISTRO DELLE POLITICHE AGRICOLE ALIMENTARI E FORESTALI

Vista la direttiva 98/57/CE del Consiglio, del 20 luglio 1998, concernente la lotta contro la *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.;

Visto il decreto ministeriale 23 febbraio 2000, recante «Recepimento della direttiva n. 98/57/CE del Consiglio concernente la lotta contro *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.»;

Vista la direttiva 2000/29/CE del Consiglio, dell'8 maggio 2000, concernente le misure di protezione contro l'introduzione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali e contro la loro diffusione nella Comunità, e successive modificazioni e integrazioni;

Visto il decreto legislativo 19 agosto 2005, n. 214, recante «Attuazione della direttiva 2002/89/CE concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali»;

Vista la direttiva della Commissione 2006/63/CE del 14 luglio 2006, che modifica gli allegati da II a VII della direttiva 98/57/CE del Consiglio concernente la lotta contro *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.;

Considerata la necessità di recepire la direttiva della Commissione 2006/63/CE del 14 luglio 2006 sopracitata;

Acquisito il parere favorevole del Comitato fitosanitario nazionale, di cui all'art. 52 del decreto legislativo 19 agosto 2005, n. 214, espresso nella seduta del 19 e 20 settembre 2007;

Acquisito il parere favorevole della Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province Autonome di Trento e di Bolzano, espresso nella seduta del 30 ottobre 2007;

Decreta:

Art. 1.

Finalità

1. Il presente decreto ha per oggetto il recepimento della direttiva 2006/63/CE della Commissione, del 14 luglio 2006, che modifica gli allegati da II a VII della direttiva 98/57/CE del Consiglio del 20 luglio 1998, concernente la lotta contro la *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

2. Il presente decreto stabilisce i provvedimenti di natura fitosanitaria da adottare sul territorio della Repubblica italiana per la lotta all'organismo nocivo *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., già noto come *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, agente dell'avvizzimento batterico delle solanacee, con specifico riferimento alle piante ospiti elencate nell'allegato I, sezione 1.

3. La lotta a *Ralstonia solanacearum* ha lo scopo di:

a) localizzarlo e determinarne la distribuzione;

b) prevenirne la comparsa e la disseminazione;

c) prevenirne la propagazione ed attuare misure fitosanitarie ai fini della sua eradicazione qualora venga individuato.

Art. 2.

Monitoraggio ufficiale

1. Ogni anno i Servizi fitosanitari regionali effettuano accertamenti ufficiali sistematici riguardanti la presenza di *Ralstonia solanacearum* nel materiale vegetale elencato in allegato I, sezione I. Nei casi in cui i Servizi fitosanitari regionali valutino elevato il rischio della presenza di *Ralstonia solanacearum* in una certa zona di produzione e vi sia la concreta possibilità di disseminazione del patogeno da quella stessa zona, i Servizi fitosanitari regionali estendono i controlli sistematici ufficiali anche ad altri vegetali, comprese le solanacee spontanee ospiti, nonché alle acque superficiali usate per l'irrigazione o l'irrorazione del materiale vegetale in questione e a quelle reflue di impianti di trasformazione o di confezionamento.

2. La portata degli accertamenti mirati è definita in funzione dei rischi identificati. I Servizi fitosanitari regionali possono inoltre effettuare accertamenti ufficiali per la ricerca di *Ralstonia solanacearum* in altri materiali, quali terreno di coltura, suolo e rifiuti solidi di impianti di trasformazione industriale o di confezionamento.

3. Gli accertamenti ufficiali di cui ai commi 1 e 2 sono effettuati:

a) per il materiale vegetale elencato nell'allegato I, sezione I, secondo le indicazioni dell'allegato I, sezione II, punto 1;

b) per le piante ospiti diverse dal materiale vegetale elencato, nonché per le acque, comprese le acque reflue, in base a metodi appropriati e, se del caso, sono prelevati campioni da sottoporre a prove di laboratorio ufficiali o sotto controllo ufficiale;

c) se del caso, su altri materiali in base a metodi appropriati.

Inoltre i Servizi fitosanitari regionali, se del caso, stabiliscono per tali accertamenti specifiche procedure di ispezione concernenti il numero, l'origine, la distribuzione ed il momento del prelievo dei campioni, sulla base di fondati principi scientifici e statistici nonché in relazione alla biologia di *Ralstonia solanacearum*, a specifici sistemi di produzione del materiale vegetale elencato e delle altre piante ospiti dell'organismo nocivo.

4. I Servizi fitosanitari regionali notificano annualmente al Servizio fitosanitario centrale le specifiche modalità ed i risultati degli accertamenti ufficiali di cui ai commi 1 e 2.

Dette notifiche sono effettuate dai Servizi fitosanitari regionali entro il 30 aprile, ad eccezione di quelle relative alle patate usate come sementi ottenute dall'agricoltore e utilizzate nella sua azienda, da comunicare entro il 1° agosto.

Il Servizio fitosanitario centrale provvede a notificarli, entro il 1° giugno ed il 1° settembre rispettivamente, agli altri Stati membri e alla Commissione U.E., secondo le prescrizioni dell'allegato I, sezione II, punto 2. Le modalità specifiche e i risultati concernenti le colture si riferiscono alla produzione dell'anno precedente.

Art. 3.

Denuncia obbligatoria

1. Chiunque venga a conoscenza di casi sospetti o accertati della presenza di *Ralstonia solanacearum* ne da comunicazione immediata al Servizio fitosanitario regionale competente per territorio.

Art. 4.

Casi sospetti

1. In caso di presenza sospetta del patogeno, il Servizio fitosanitario regionale competente per territorio provvede ad effettuare prove di laboratorio ufficiali o sotto controllo ufficiale utilizzando, per il materiale vegetale elencato, il metodo appropriato di cui all'allegato II e secondo quanto disposto nell'allegato III, punto 1, ovvero, in tutti gli altri casi, secondo un qualsiasi altro metodo ufficialmente approvato, al fine di confermare o smentire la sospetta presenza. In caso di conferma si applicano le disposizioni dell'allegato III, punto 2.

2. I Servizi fitosanitari regionali, in attesa della conferma o della smentita della presenza sospetta di cui al comma 1 e comunque in ogni caso di presenza sospetta nella quale:

i) siano stati individuati sintomi tipici della malattia e il saggio di selezione preliminare di cui all'allegato II, sezione I, punto 1 e sezione II abbia dato esito positivo; oppure,

ii) il saggio di selezione preliminare di cui all'allegato II, sezione I, punto 2 e sezione III abbia dato esito positivo;

per quanto riguarda le partite in questione:

a) vietano il movimento delle piante e dei tuberi di tutte le colture, partite o spedizioni da cui sono stati prelevati i campioni, a meno che esso non avvenga sotto il loro stesso controllo e purché sia stata accertata l'inesistenza di rischi effettivi di disseminazione di *Ralstonia solanacearum*;

b) attuano opportuni interventi per risalire all'origine della presenza sospetta;

c) adottano altri provvedimenti cautelativi commisurati al rischio stimato, in particolare per quanto riguarda la produzione del materiale vegetale elencato ed il movimento di partite di tuberi-seme di patata, diverse da quelle di cui alla lettera *a)*, prodotto nel luogo da cui sono stati prelevati i campioni di cui a detta lettera *a)*, onde scongiurare la disseminazione di *Ralstonia solanacearum*.

3. Nei casi di presenza sospetta in cui esista un rischio di contaminazione del materiale vegetale elencato o delle acque superficiali da o in una o più regioni, il Servizio fitosanitario regionale nel cui territorio di competenza è stata segnalata la presenza sospetta, notifica immediatamente al Servizio fitosanitario centrale ed agli altri Servizi fitosanitari regionali interessati le caratteristiche della manifestazione stessa, a seconda del rischio identificato; detti Servizi fitosanitari regionali collaborano opportunamente tra loro.

4. Nei casi in cui il rischio coinvolga altri Stati membri della U.E., i Servizi fitosanitari regionali segnalano il caso al Servizio fitosanitario centrale che provvede a sua volta a notificare immediatamente il caso alla Commissione U.E. ed agli Stati membri interessati.

Art. 5.

Casi accertati

1. Qualora le prove di laboratorio ufficiali o condotte sotto controllo ufficiale applicando, per il materiale vegetale elencato, il metodo appropriato di cui all'allegato II oppure, in tutti gli altri casi, un qualsiasi

metodo ufficialmente approvato, confermino la presenza dell'organismo nocivo in un campione prelevato a norma del presente decreto, i Servizi fitosanitari regionali, sulla base di fondati principi scientifici, della biologia dell'organismo nocivo e dei particolari sistemi di produzione, lavorazione e commercializzazione delle piante ospiti di tale organismo nocivo in detta regione:

a) per il materiale vegetale elencato all'allegato I:

i) avviano un accertamento per determinare l'entità della contaminazione e la sua fonte o fonti primarie, ai sensi delle disposizioni dell'allegato IV ed eseguono ulteriori esami a norma dell'art. 4, punto 1, almeno su tutte le scorte di tuberi-seme di patata che hanno una relazione clonale, e

ii) dichiarano contaminati il materiale vegetale elencato, le spedizioni e/o le partite da cui è stato prelevato il campione, nonché i macchinari, i veicoli, i contenitori, i magazzini, o le relative parti e qualsiasi altro oggetto, compresi i materiali di imballaggio, che sia stato a contatto col materiale vegetale elencato da cui è stato prelevato il campione; dichiarano altresì contaminati, se del caso, il terreno o i terreni, l'appezzamento o gli appezzamenti di produzione del vegetale nonché il luogo o i luoghi di produzione dove è stato raccolto il materiale vegetale elencato e da cui è stato prelevato il campione; inoltre, per i campioni prelevati durante la stagione di crescita, dichiarano contaminati il terreno o i terreni, il luogo o i luoghi di produzione e, se del caso, l'appezzamento o gli appezzamenti di produzione sotto coltura protetta del vegetale da cui è stato prelevato il campione;

iii) determinano l'entità della contaminazione probabile derivante da contatti prima o dopo la raccolta, collegata col ciclo produttivo, l'irrigazione o l'irrorazione o da relazioni clonali con la contaminazione dichiarata, ai sensi delle disposizioni dell'allegato V, punto 1, e

iv) delimitano una zona in base alla dichiarazione di contaminazione di cui al punto *ii)*, alla determinazione dell'entità della contaminazione probabile di cui al punto *iii)* e alla potenziale propagazione dell'organismo nocivo, tenendo conto delle disposizioni dell'allegato V, paragrafo 2, punto *i)*;

b) per le colture o le piante ospiti diverse da quelle menzionate nella lettera *a)*, dove sia stato riconosciuto che sussiste un rischio per la produzione del materiale vegetale elencato:

i) avviano una ricerca ai sensi della lettera *a)*, punto *i)*, e

ii) dichiarano contaminate le piante ospiti dell'organismo nocivo da cui è stato prelevato il campione, e

iii) determinano l'entità della contaminazione probabile e delimitano una zona, ai sensi, rispettivamente, della lettera *a)*, punti *iii)* e *iv)* e in rapporto alla produzione del materiale vegetale elencato;

c) per le acque superficiali (comprese le acque reflue di lavorazione industriali o di stabilimenti di confezionamento che manipolano materiale vegetale elencato) e per le piante spontanee ospiti, dove sia stato riconosciuto che la produzione del materiale vegetale elencato è esposta ad un rischio di contaminazione attraverso l'irrigazione, l'irrorazione o l'inondazione con acque superficiali:

i) avviano un accertamento, comprendente esami ufficiali da effettuare nei momenti appropriati su campioni di acque superficiali nonché sulle piante spontanee ospiti eventualmente presenti, per determinare l'entità della contaminazione, e

ii) dichiarano contaminate le acque superficiali da cui sono stati prelevati campioni, nella misura appropriata e in base all'accertamento di cui al punto *i)*, e

iii) determinano l'entità della contaminazione probabile e delimitano una zona in base alla dichiarazione di contaminazione di cui al punto *ii)*, e alla possibile propagazione dell'organismo nocivo, tenendo conto delle disposizioni dell'allegato V.

2. I Servizi fitosanitari regionali notificano immediatamente al Servizio fitosanitario centrale, ai sensi delle disposizioni dell'allegato V, punto 3, i casi di contaminazione dichiarata ai sensi del comma 1, lettera *a)*, punto *ii)*, e lettera *c)*, punto *ii)*, nonché i dati specifici relativi alla delimitazione della zona di cui al comma 1, lettera *a)*, punto *iv)*, e, se del caso, al comma 1, lettera *c)*, punto *iii)*. Contemporaneamente il Servizio fitosanitario centrale presenta alla Commissione la notifica supplementare di cui al punto 4 dell'allegato V.

3. In seguito alla notifica di cui al comma 2 e in base agli elementi ivi menzionati, i Servizi fitosanitari regionali che hanno notificato al Servizio fitosanitario centrale avviano un accertamento a norma del comma 1, lettera *a)*, punto *i)*, e, dove applicabile, del comma 1, lettera *c)*, punto *i)*, e, se del caso, intraprendono ulteriori azioni a norma dei commi 1 e 2.

Art. 6.

Interventi fitosanitari

1. I Servizi fitosanitari regionali vietano la messa a dimora del materiale vegetale elencato nell'allegato I, dichiarato contaminato ai sensi dell'art. 5, comma 1, lettera *a)*, punto *ii)*, e dispongono che detto materiale, sotto il loro controllo, sia soggetto ad una delle disposizioni dell'allegato VI, punto 1, in modo che sia assicurata l'inesistenza di rischi identificabili di propagazione dell'organismo nocivo.

2. I Servizi fitosanitari regionali vietano la messa a dimora del materiale vegetale elencato ritenuto probabilmente contaminato ai sensi dell'art. 5, comma 1, let-

tera *a)*, punto *iii)*, e lettera *c)*, punto *iii)* - compreso il materiale vegetale elencato per il quale è stato individuato un rischio, prodotto in luoghi ritenuti probabilmente contaminati ai sensi dell'art. 5, comma 1, lettera *a)*, punto *iii)* - e dispongono che, sotto il loro controllo, sia destinato ad un impiego appropriato o sia eliminato ai sensi dell'allegato VI, punto 2, in modo che sia assicurata l'inesistenza di rischi identificabili di propagazione dell'organismo nocivo.

3. I Servizi fitosanitari regionali prescrivono che i macchinari, i veicoli, i contenitori, i magazzini o le relative parti, nonché qualsiasi altro oggetto, compresi i materiali di imballaggio, dichiarati contaminati ai sensi dell'art. 5, comma 1, lettera *a)*, punto *ii)*, o ritenuti probabilmente contaminati ai sensi dell'art. 5, comma 1, lettera *a)*, punto *iii)* e lettera *c)*, punto *iii)*, siano distrutti o decontaminati secondo i metodi adeguati di cui all'allegato VI, punto 3.

4. Fatte salve le misure attuate ai sensi dei commi 1, 2 e 3, i Servizi fitosanitari regionali prescrivono che, nelle zone delimitate ai sensi dell'art. 5, comma 1, lettera *a)*, punto *iv)*, e lettera *c)*, punto *iii)*, sia applicata una serie di misure come precisato nell'allegato VI, punti 4.1 e 4.2.

5. I dati relativi a tali misure sono notificati ogni anno al Servizio fitosanitario centrale che li comunica alla Commissione U.E.

Art. 7.

Interventi su cloni di patata da seme

1. I tuberi-seme di patata devono essere conformi ai requisiti della direttiva 2000/29/CE del Consiglio e derivare direttamente da materiali, ottenuti nell'ambito di un programma ufficialmente approvato dall'Ente nazionale delle sementi elette, risultati esenti dall'organismo nocivo in prove ufficiali o sotto controllo ufficiale, eseguite utilizzando il metodo appropriato di cui all'allegato II. Dette prove sono eseguite dai Servizi fitosanitari regionali:

a) qualora sia stata confermata la presenza di *Ralstonia solanacearum* nella produzione di tuberi-seme di patate nel territorio di propria competenza:

i) mediante saggi effettuati sulle precedenti propagazioni, compresa la selezione clonale di partenza, e saggi sistematici effettuati su cloni di tuberi-seme di patate di base, oppure

ii) qualora sia stata accertata l'assenza di relazione clonale, mediante saggi effettuati su tutti i cloni di tuberi seme di patate di base o su precedenti propagazioni, compresa la selezione clonale di partenza, e

b) negli altri casi, su ciascuna pianta della selezione clonale di partenza oppure su campioni rappresentativi dei tuberi-seme di base o di precedenti propagazioni.

Art. 8.

Divieti

1. È vietata la detenzione e la manipolazione dell'organismo nocivo *Ralstonia solanacearum*.

Art. 9.

Deroghe

1. Fatte salve le disposizioni della direttiva 2000/29/CE del Consiglio, il Servizio fitosanitario centrale, sentito il parere del Servizio fitosanitario regionale competente per territorio, può autorizzare deroghe alle disposizioni degli articoli 6 e 8 del presente decreto, ai sensi delle disposizioni del Titolo X del decreto legislativo n. 214/2005, per prove o scopi scientifici e per lavori di selezione varietale.

Art. 10.

Interventi supplementari

1. A salvaguardia delle produzioni i Servizi fitosanitari regionali possono adottare, qualora risultino necessarie, misure supplementari o più rigorose per combattere l'organismo nocivo o per prevenirne la disseminazione, sempreché siano conformi alle disposizioni della direttiva 2000/29/CE.

2. Tali misure sono notificate agli altri Servizi fitosanitari regionali ed al Servizio fitosanitario centrale che provvederà a darne comunicazione alla Commissione U.E.

Art. 11.

Abrogazioni

1. Il decreto ministeriale 23 febbraio 2000 è abrogato.

Il presente decreto sarà inviato alla Corte dei conti per la registrazione ed entrerà in vigore il giorno successivo alla sua pubblicazione nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, 30 ottobre 2007

Il Ministro: DE CASTRO

Registrato alla Corte dei conti il 3 dicembre 2007
Ufficio di controllo sui Ministeri delle attività produttive, registro n. 4, foglio n. 208

ALLEGATO I

SEZIONE I

Elenco delle piante ospiti di Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al. di cui all'articolo 1

Piante (compresi i tuberi) diverse dai semi veri di Solanum tuberosoum L. Patata

Piante diverse dai semi di Lycopersicon lycopersicum (L.) Karsten ex Farw. Pomodoro

SEZIONE II

Accertamenti

1. Gli accertamenti ufficiali di cui all'articolo 2, paragrafo 2, lettera a), debbono essere basati sulla biologia del microrganismo nocivo e sul particolare sistema di produzione nello Stato membro interessato. Essi debbono comprendere:

   i) nel caso delle patate,

   - a momenti appropriati, l'ispezione visuale della pianta durante la crescita e/o il prelievo di campioni di tuberi-seme e di altre patate durante la stagione di crescita oppure in magazzino. Questi campioni debbono essere sottoposti a ispezione visuale ufficiale o sotto sorveglianza ufficiale, comportante il sezionamento dei tuberi, e inoltre,
   - nel caso dei tuberi-seme e, se del caso, di altre patate, esami di laboratorio, ufficiali o sotto sorveglianza ufficiale secondo il metodo di cui all'allegato II;

   ii) nel caso del pomodoro,

   - l'ispezione visuale, a momenti appropriati, almeno durante la crescita delle piante destinate al reimpianto ad usi professionali.

2. La notifica degli accertamenti ufficiali di cui all'articolo 2, paragrafo 3, deve comprendere:

   i) nel caso delle patate,

   - la superficie totale, valutata in ettari, coltivata a patate da seme e ad altri tipi di patata,
   - la stratificazione per categoria (patate da seme e da consumo), e se del caso, per regione,
   - il numero dei campioni prelevati per l'esame e il calendario dei prelievi,
   - il numero di ispezioni visuali sul terreno,
   - il numero delle ispezioni visuali sui tuberi (e l'entità dei campioni);

   ii) nel caso delle piante di pomodori, almeno durante la crescita, destinate al reimpianto ad usi professionali,

   - numero totale stimato delle piante,
   - il numero delle ispezioni visuali;

   iii) nel caso delle piante ospiti diverse dalla patata e dal pomodoro, comprese le solanacee selvatiche ospiti,

- la specie,
- il numero e la cadenza dei campioni prelevati,
- la zona/il corso d'acqua sottoposti a prelievo, secondo i casi,
- il metodo di analisi;

iv) nel caso degli accertamenti sull'acqua e sugli scarichi di reflui degli impianti di trasformazione industriale o di imballaggio,

- il numero e la cadenza dei campioni,
- la zona/il corso d'acqua/l'ubicazione dell'impianto sottoposti a prelievo, secondo i casi,
- il metodo di analisi.

ALLEGATO II

SCHEMA PER LA DIAGNOSI, IL RILEVAMENTO E L'IDENTIFICAZIONE DI *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI *ET AL.*

CAMPO DI APPLICAZIONE DELLO SCHEMA DIAGNOSTICO

Lo schema presentato descrive i procedimenti da utilizzare per:

i) la diagnosi del marciume bruno nei tuberi di patata e dell'avvizzimento batterico nelle piante di patata e di pomodoro e in alcune altre piante ospiti;

ii) il rilevamento di *Ralstonia solanacearum* in campioni di tuberi di patata, di piante di patata, di pomodoro e in altre piante ospiti, nonché in campioni di acqua e di terreno;

iii) l'identificazione di *Ralstonia solanacearum (R. solanacearum)*.

PRINCIPI GENERALI

I protocolli ottimizzati per i vari metodi, i reagenti convalidati e i dettagli per la preparazione del materiale per i saggi ed i controlli figurano nelle appendici. Un elenco dei laboratori coinvolti nell'ottimizzazione e convalida dei protocolli figura nell'appendice 1.

Dato che i protocolli comportano il rilevamento di un organismo da quarantena e prevedono l'uso di colture vitali di *R. solanacearum* come materiale di controllo, le procedure dovranno essere svolte in opportune condizioni di quarantena, con adeguate strutture per lo smaltimento dei rifiuti e secondo le modalità e le condizioni previste da appropriate autorizzazioni rilasciate dalle autorità ufficiali per la quarantena dei vegetali.

I parametri dei saggi devono garantire un rilevamento certo e riproducibile dei livelli di *R. solanacearum* ai valori di soglia dei metodi prescelti.

È indispensabile un'accurata preparazione dei controlli positivi.

La realizzazione dei saggi sulla base delle soglie richieste implica inoltre la corretta regolazione, manutenzione e taratura degli strumenti, una corretta manipolazione e conservazione dei reagenti nonché l'applicazione di tutte le misure atte ad impedire la contaminazione tra i campioni, come ad esempio la separazione dei controlli positivi dai campioni da saggiare. Per evitare errori amministrativi e di altro genere devono essere applicate misure uniformi per il controllo della qualità, in particolare per quanto riguarda l'etichettatura e la documentazione.

Una manifestazione sospetta ai sensi dell'articolo 4, paragrafo 2, della direttiva 98/57/CE implica un risultato positivo nei saggi diagnostici o di selezione preliminare fatti su un campione secondo quanto indicato nei diagrammi di flusso. Se il primo saggio di selezione preliminare (IF, PCR/FISH o isolamento selettivo) risulta positivo, esso deve essere confermato da un secondo saggio di selezione preliminare basato su un principio biologico differente.

Se il primo saggio di selezione preliminare risulta positivo, si sospetta una contaminazione da *R. solanacearum* ed occorre procedere ad un secondo saggio. Se il secondo saggio di selezione preliminare è positivo, il sospetto è confermato (manifestazione sospetta) ed occorre procedere ai saggi analitici successivi, secondo quanto previsto dallo schema. Se il secondo saggio di selezione preliminare è negativo, il campione non si considera contaminato da *R. solanacearum*.

Per confermare la presenza di *R. solanacearum* ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, della direttiva 98/57/CE è necessario isolare e identificare l'organismo in coltura pura e verificarne la patogenicità.

SEZIONE I

APPLICAZIONE DELLO SCHEMA

1. **Schema di rilevamento per la diagnosi del marciume bruno e dell'avvizzimento batterico (*Ralstonia solanacearum*) nei tuberi di patata, nelle piante di patata e di pomodoro o in altre piante ospiti che presentano sintomi di queste malattie.**

   Il procedimento sottoindicato deve essere applicato ai tuberi e alle piante di patata che presentano sintomi tipici o sospetti di marciume bruno o di avvizzimento associato ad alterazioni vascolari. Esso comporta un saggio rapido di selezione preliminare, l'isolamento dell'agente patogeno dal tessuto vascolare infetto su terreni di coltura (selettivi) e, in caso di esito positivo, l'identificazione della coltura come *Ralstonia solanacearum*.

Tuberi di patata, piante di patata o di pomodoro o altre piante ospiti con sintomi sospetti di marciume bruno o avvizzimento batterico ([1])
SAGGI DIAGNOSTICI RAPIDI ([2])
Svolgere almeno uno dei seguenti saggi per una diagnosi presuntiva:
— Prova di fuoriuscita di essudato batterico dal fusto ([3])
— Saggio del poli-beta-idrossibutirrato ([4])
— Saggio sierologico di agglutinazione ([5])
— Saggio IF ([6]) / Saggio FISH ([7]) / Saggio ELISA ([8]) / Saggio PCR ([9])
SAGGIO DI ISOLAMENTO PRINCIPALE ([10])
Colonie con morfologia tipica ([11])
NO ([12])
R. solanacearum non rilevato
Campione non infetto da R. solanacearum
SÌ
Purificazione mediante subcoltura
SAGGI DI IDENTIFICAZIONE ([13])
PROVA DI PATOGENICITÀ ([14])
Entrambe le prove confermano l'identificazione della coltura pura come R. solanacearum
NO
Campione non infetto da R. solanacearum
SÌ
Campione infetto da R. solanacearum

(1) La descrizione dei sintomi è fornita nella sezione II.1.

(2) I saggi diagnostici rapidi facilitano la formulazione di una diagnosi presunta ma non sono fondamentali. Un risultato negativo non sempre garantisce l'assenza del patogeno.

(3) La prova della fuoriuscita dell'essudato batterico dal tessuto vascolare del fusto è descritta alla sezione VI.A.1.

(4) Il saggio di rilevamento dei granuli di poli-beta-idrossibutirrato nelle cellule batteriche è descritto nella sezione VI.A.2.

(5) I saggi sierologici di agglutinazione sull'essudato batterico o su estratti da tessuti sintomatici sono descritti nella sezione VI.A.3.

(6) Il saggio IF sull'essudato batterico sospeso in acqua o su estratti di tessuto sintomatico è descritto nella sezione VI.A.5.

(7) Il saggio FISH sull'essudato batterico sospeso in acqua o su estratti di tessuto sintomatico è descritto nella sezione VI.A.7.

(8) Il saggio ELISA sull'essudato batterico sospeso in acqua o su estratti di tessuto sintomatico è descritto nella sezione VI.A.8.

(9) Il saggio PCR sull'essudato batterico sospeso in acqua o su estratti di tessuto sintomatico è descritto nella sezione VI.A.6.

(10) Di norma l'isolamento del patogeno dal materiale vegetale sintomatico risulta agevole mediante la tecnica dell'inseminazione delle piastre con distribuzione in gradiente di concentrazione delle diluizioni della sospensione acquosa dell'estratto di materiale vegerale (sezione II.3).

(11) La morfologia tipica della colonia è descritta nella sezione II.3.d.

(12) In fasi avanzate di infezione la crescita delle colonie può non aver luogo a causa della competizione o di un'eccessiva proliferazione di batteri saprofiti. Se i sintomi della malattia sono tipici ma il saggio di isolamento è negativo, esso deve essere ripetuto, preferibilmente su un substrato selettivo.

(13) È possibile ottenere un'identificazione affidabile di una coltura pura di presunti isolati di *R. solanacearum* usando i saggi elencati nella sezione VI.B. La caratterizzazione della sottospecie è facoltativa, ma consigliabile per ciascun nuovo caso.

(14) Il saggio di patogenicità è descritto nella sezione VI.C.

2. **Schema di rilevamento e identificazione di *Ralstonia solanacearum* in campioni di tuberi di patata asintomatici**

Principi

Il procedimento è diretto a rilevare le infezioni latenti nei tuberi di patata. Un risultato positivo ottenuto da almeno due saggi di selezione preliminare[3], basati su principi biologici differenti, deve essere confermato dall'isolamento del patogeno e quindi, in caso di isolamento di colonie tipiche, dall'identificazione di una coltura pura di *R. solanacearum*. Il fatto che uno solo dei saggi di selezione preliminare risulti positivo non è sufficiente per far considerare sospetto il campione.

I saggi di selezione preliminare e i saggi di isolamento devono consentire soglie di rilevamento comprese tra 10^3 e 10^4 cellule per ml di sedimento risospeso, incluse come controllo positivo in ciascuna serie di saggi analitici.

Campione di tuberi di patata (1)
Estrazione e concentrazione del patogeno (2)
SAGGI DI SELEZIONE PRELIMINARE PRINCIPALI (3)
Colorazione IF (4) / Isolamento selettivo (5) / Saggio PCR (6) / Saggio FISH (7)
Saggio supplementare facoltativo: ELISA (8)
Primo saggio di selezione preliminare (3)
Negativo
R. solanacearum non rilevato
Campione non infetto da R. solanacearum
Positivo
Secondo saggio di selezione preliminare (3)
Negativo
R. solanacearum non rilevato
Campione non infetto da R. solanacearum
Positivo
Isolamento selettivo (5) e/o saggio biologico (9)
Colonie con morfologia tipica (10)
NO (11)
R. solanacearum non rilevato
Campione non infetto da R. solanacearum
SÌ
Purificazione mediante subcoltura
SAGGI DI IDENTIFICAZIONE (12)
PROVA DI PATOGENICITÀ (13)
Entrambe le prove confermano l'identificazione della coltura pura come R. solanacearum
NO
Campione non infetto da R. solanacearum
SÌ
Campione infetto da R. solanacearum

(1) Il campione standard è di 200 tuberi. Il procedimento può essere tuttavia applicato a campioni più piccoli qualora il suddetto quantitativo non sia disponibile.

(2) I metodi di estrazione e concentrazione del patogeno sono descritti nella sezione III.1.1.

(3) Se almeno due saggi basati su principi biologici diversi danno esito positivo, occorre procedere all'isolamento e alla conferma. Eseguire almeno un saggio di selezione preliminare. In caso di esito negativo, il campione è considerato negativo. In caso di esito positivo, tale risultato deve essere confermato da un secondo o da più saggi di selezione preliminare basati su principi biologici diversi. Se il secondo o i successivi saggi di selezione preliminare risultano negativi, il campione è considerato negativo. Non sono necessari ulteriori saggi.

(4) Il saggio IF è descritto nella sezione VI.A.5.

(5) Il saggio di isolamento selettivo è descritto nella sezione VI.A.4.

(6) I saggi PCR sono descritti nella sezione VI.A.6.

(7) Il saggio FISH è descritto nella sezione VI.A.7.

(8) I saggi ELISA sono descritti nella sezione VI.A.8.

(9) Il saggio biologico è descritto nella sezione VI.A.9.

(10) La morfologia tipica della colonia è descritta nella sezione II.3.d.

(11) L'esito delle colture o del saggio biologico può essere compromesso a causa di una competizione o inibizione da parte di batteri saprofiti. Se le prove di selezione preliminare danno esito positivo ma i saggi di isolamento sono negativi, ripetere questi ultimi sullo stesso precipitato oppure prelevando ulteriori tessuti vascolari in prossimità del cono ombelicale di tuberi tagliati provenienti dallo stesso campione e, se necessario, saggiare altri campioni.

(12) È possibile ottenere un'identificazione affidabile di presunte colture pure di *R. solanacearum* usando i saggi descritti nella sezione VI.B.

(13) Il saggio di patogenicità è descritto nella sezione VI.C.

3. **Schema di rilevamento e identificazione di *Ralstonia solanacearum* in campioni di piante di patata e di pomodoro o di altre piante ospiti asintomatiche**

Campione di segmenti di fusto ([1])

Estrazione e concentrazione del patogeno ([2])

SAGGI DI SELEZIONE PRELIMINARE PRINCIPALI ([3])
Isolamento selettivo ([4]) / Saggio IF ([5]) / Saggio PCR ([6]) / Saggio FISH ([7])
Saggio supplementare facoltativo: ELISA ([8]), saggio biologico ([9])

Colonie con morfologia tipica ([10]) dopo l'isolamento

Tutti i saggi effettuati sono negativi

R. solanacearum non rilevato
Campione non infetto da *R. solanacearum*

NO ([11])

SÌ

Purificazione mediante subcoltura

SAGGI DI IDENTIFICAZIONE ([12])

PROVA DI PATOGENICITÀ ([13])

Entrambe le prove confermano l'identificazione della coltura pura come *R. solanacearum*

NO

Campione non infetto da *R. solanacearum*

SÌ

Campione infetto da *R. solanacearum*

(1) Per le dimensioni raccomandate del campione cfr. la sezione III.2.1.

(2) I metodi di estrazione e concentrazione del patogeno sono descritti nella sezione III.2.1.

(3) Se almeno due saggi basati su principi biologici diversi danno esito positivo occorre procedere all'isolamento e alla conferma. Eseguire almeno un saggio di selezione preliminare. In caso di esito negativo, il campione è considerato negativo. In caso di esito positivo, tale risultato deve essere confermato da un secondo o da più saggi di selezione preliminare basati su principi biologici diversi. Qualora il secondo o gli altri saggi di selezione preliminare risultino negativi, il campione è considerato negativo. Non sono necessari ulteriori saggi.

(4) Il saggio di isolamento selettivo è descritto nella sezione VI.A.4.

(5) Il saggio IF è descritto nella sezione VI.A.5.

(6) I saggi PCR sono descritti nella sezione VI.A.6.

(7) Il saggio FISH è descritto nella sezione VI.A.7.

(8) I saggi ELISA sono descritti nella sezione VI.A.8.

(9) Il saggio biologico è descritto nella sezione VI.A.9.

(10) La morfologia tipica della colonia è descritta nella sezione II.3.d.

(11) L'esito delle colture o del saggio biologico può essere compromesso a causa di una competizione o inibizione da parte di batteri saprofiti. Se le prove di selezione preliminare danno esito positivo ma le prove di isolamento sono negative, ripetere queste ultime.

(12) È possibile ottenere un'identificazione affidabile di presunte colture pure di *R. solanacearum* utilizzando i saggi descritti nella sezione VI.B.

(13) La prova di patogenicità è descritta nella sezione VI.C.

SEZIONE II

METODI DETTAGLIATI PER IL RILEVAMENTO DI *RALSTONIA SOLANACEARUM* NEI TUBERI DI PATATA, NELLE PIANTE DI PATATA E DI POMODORO O IN ALTRE PIANTE OSPITI CHE PRESENTANO SINTOMI DI MARCIUME BRUNO O DI AVVIZZIMENTO BATTERICO.

1. **Sintomi** (cfr. il sito web http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)

1.1. Sintomi nella patata

Pianta di patata. La fase iniziale dell'infezione in pieno campo si riconosce dalla perdita di turgore delle foglie della parte superiore della pianta con le alte temperature diurne, reversibile durante la notte. Nelle prime fasi dell'avvizzimento le foglie rimangono verdi, successivamente compaiono ingiallimento, necrosi brune nonché epinastia. L'avvizzimento di un germoglio o della pianta intera si aggrava, diventa presto irreversibile e porta a collasso e morte della pianta. Il tessuto vascolare dei fusti di piante avvizzite tagliato trasversalmente di solito si presenta bruno e gocciole di un liquido lattiginoso possono essudare dalla superficie tagliata o essere facilmente fatte uscire per compressione. Quando un fusto tagliato trasversalmente viene immerso verticalmente nell'acqua limpida e in quiete di un bicchiere, filamenti biancastri scendono dai tessuti vascolari verso il fondo.

Tubero di patata. I tuberi di patata devono essere tagliati trasversalmente vicino all'ombelico (punto di attacco dello stolone) oppure longitudinalmente sopra al punto di attacco dello stolone. La fase iniziale dell'infezione consiste in un'alterazione di colore da giallo vitreo a marrone chiaro dell'anello vascolare, da cui dopo pochi minuti fuoriesce spontaneamente un liquido batterico color crema chiaro. In seguito la decolorazione vascolare diventa di un marrone più netto e la necrosi può estendersi al tessuto parenchimatico. Nelle fasi avanzate l'infezione si espande centrifugamente sino ad emergere in corrispondenza dell'ombelico e degli occhi dai quali può fuoriuscire essudato batterico cui rimangono aderenti particelle di terreno. Sulla superficie dei tuberi possono comparire tacche bruno-rossastre, leggermente infossate, dovute al collasso interno dei tessuti vascolari. Nelle fasi avanzate della malattia è frequente lo sviluppo secondario di marciume molle causato da funghi e batteri.

1.2. Sintomi nel pomodoro

Pianta di pomodoro. Il primo sintomo visibile è l'aspetto flaccido delle foglie più giovani. In condizioni ambientali favorevoli per l'agente patogeno (temperature del suolo di circa 25 °C, umidità satura) in pochi giorni seguono epinastia e flaccidezza di un lato della pianta o dell'intera pianta, portando la stessa al collasso totale. In condizioni meno favorevoli (temperatura del suolo inferiore a 21 °C) l'avvizzimento ha evoluzione più lenta, ma sul fusto possono svilupparsi numerose radici avventizie. Si possono osservare striature idropiche che partono dalla base del fusto, indice di necrosi del sistema vascolare. Quando il fusto è tagliato trasversalmente, dai tessuti vascolari bruni scoloriti essudano gocce di liquido batterico bianco o giallastro.

1.3. Sintomi in altre piante ospiti

Piante di Solanum dulcamara e S. nigrum. In condizioni naturali è raro rilevare sintomi di collasso e avvizzimento in queste piante erbacee ospiti, tranne nel caso in cui le temperature del suolo siano superiori a 25 °C o i livelli di inoculo siano assai elevati (come ad esempio per un *S. nigrum* che cresca in prossimità di piante infette di patata o di pomodoro). Qualora compaia avvizzimento, i sintomi sono gli stessi descritti per le piante di pomodoro. Le piante di *S. dulcamara* che non presentano segni di avvizzimento e che si sviluppano con radici e fusti in acqua possono presentare uno scolorimento interno color marrone chiaro dei tessuti vascolari nella sezione trasversale della base del fusto o di sue parti subacquee. Può esservi fuoriuscita di essudato batterico dai tessuti vascolari recisi o formazione di filamenti di essudato se il fusto reciso viene collocato verticalmente in acqua, anche in assenza di sintomi di avvizzimento.

2. **Saggi rapidi di selezione preliminare**

I saggi rapidi di selezione preliminare facilitano la formulazione di una diagnosi presunta, ma non sono fondamentali. Effettuare uno o più dei seguenti saggi convalidati:

2.1. Prova di fuoriuscita di essudato dal fusto

(cfr. sezione VI.A.1)

2.2. Rilevamento dei granuli di poli-beta-idrossibutirrato (PHB)

I caratteristici granuli di PHB nelle cellule di *Ralstonia solanacearum* sono resi visibili colorando con blu Nilo A o nero Sudan B strisci di essudato batterico provenienti da tessuto infetto, fissati mediante calore su un vetrino da microscopio (cfr. sezione VI.A.2).

2.3. Prove di sieroagglutinazione

(cfr. sezione VI.A.3)

2.4. Altri saggi

Altri saggi rapidi appropriati per la selezione preliminare sono il saggio IF (sezione VI.A.5), il saggio FISH (sezione VI.A.7), i saggi ELISA (sezione VI.A.8) e i saggi PCR (sezione VI.A.6).

3. **Metodo di isolamento**

a) Rimuovere l'essudato o le parti di tessuto cromaticamente alterate dall'anello vascolare del tubero di patata e dai fasci vascolari del fusto delle piante di patata, di pomodoro o di altre piante ospiti che presentano segni di avvizzimento. Sospenderlo in una piccola quantità di acqua distillata sterile o in tampone fosfato 50 mM (appendice 4) e lasciar riposare per 5-10 minuti.

b) Preparare una serie di diluizioni decimali della sospensione.

c) Trasferire 50-100 µl della sospensione e delle diluizioni su un terreno nutritivo generale (NA, YPGA o SPA; cfr. appendice 2) e/o sul substrato di Kelman al tetrazolio (cfr. appendice 2) e/o su di un terreno selettivo convalidato (SMSA; cfr. appendice 2). Inseminare le piastre distribuendo le sospensioni in modo decrescente sulla superficie. Se utile, preparare a parte una serie di piastre con sospensioni diluite di *Ralstonia solanacearum* biovar 2 come controllo positivo.

d) Mantenere le piastre in incubazione per 2-6 giorni a 28 °C.

— Sul terreno nutritivo non selettivo gli isolati virulenti di *R. solanacearum* sviluppano colonie di colore bianco perlaceo, piatte, irregolari e fluide, spesso con caratteristici vortici al centro. Le forme avirulente di *R. solanacearum* sviluppano piccole colonie tonde, non fluide e butirrose, di colore uniforme bianco panna.

— Sul substrato di Kelman e sul substrato SMSA i vortici sono di color rosso sangue. Le forme avirulente di *R. solanacearum* sviluppano piccole colonie tonde, non fluide e butirrose, di colore uniforme rosso scuro.

4. **Saggi di identificazione di R. solanacearum**

I saggi di conferma dell'identificazione di presunti isolati di *R. solanacearum* sono elencati nella sezione VI.B.

SEZIONE III

1. **Metodi dettagliati per il rilevamento e l'identificazione di *Ralstonia solanacearum* in campioni di tuberi di patata asintomatici**

1.1. Preparazione del campione

Nota:

— Il campione standard è di 200 tuberi per analisi. Un campionamento più ampio richiede l'effettuazione di più analisi su campioni di queste dimensioni. Un maggior numero di tuberi nel campione è causa di inibizione o difficile interpretazione dei risultati. Il metodo di analisi può essere tuttavia applicato efficacemente anche a campioni di dimensioni inferiori, qualora non si disponga di 200 tuberi.

— La convalida di tutti i metodi di rilevamento descritti di seguito è basata su analisi effettuate su campioni di 200 tuberi.

— L'estratto di patata descritto di seguito può essere anche usato per il rilevamento del batterio del marciume anulare della patata (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*).

Trattamento preliminare facoltativo da far precedere alla preparazione del campione:

a) Incubare i campioni a 25-30 °C per un massimo di due settimane prima di iniziare i saggi analitici, per favorire la moltiplicazione di eventuali popolazioni di *R. solanacearum*.

b) Lavare i tuberi. Usare disinfettanti appropriati (composti clorurati qualora si proceda al saggio PCR, al fine di eliminare l'eventuale DNA del patogeno) e detergenti tra un campione e l'altro. Far asciugare i tuberi all'aria. Questo procedimento di lavaggio non è obbligatorio, ma risulta particolarmente utile per i campioni che presentano residui di terra e nel caso in cui si debba effettuare un saggio PCR o un isolamento diretto.

1.1.1. Rimuovere con un bisturi o con un pelapatate pulito e disinfettato la buccia intorno all'ombelico (punto di attacco dello stolone) di ciascun tubero, in modo da rendere visibile il tessuto vascolare. Asportare accuratamente un piccolo cono di tessuto vascolare dall'ombelico di ciascun tubero, riducendo al minimo la quantità di tessuto non vascolare (cfr. il sito web http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

NB: Mettere da parte i tuberi (marcescenti) con sintomi sospetti e saggiarli individualmente.

Se nel corso dell'asportazione del cono ombelicale si osservano sintomi sospetti di marciume bruno, è necessario procedere ad un'indagine visiva del tubero tagliando quest'ultimo vicino all'ombelico. I tuberi tagliati che presentano sintomi sospetti devono essere tenuti per almeno 2 giorni a temperatura ambiente in modo da consentire la suberificazione e quindi conservati ad una temperatura compresa tra 4 e 10 °C in adeguate condizioni di quarantena. Tutti i tuberi, compresi quelli sospetti, devono essere conservati secondo quanto previsto all'allegato III.

1.1.2. Raccogliere i coni ombelicali in contenitori monouso nuovi che possano essere chiusi e/o sigillati (qualora vengano riutilizzati, i contenitori devono essere puliti e disinfettati accuratamente mediante composti clorurati). I coni ombelicali andrebbero di preferenza trattati immediatamente. Se ciò non fosse possibile, conservarli nel contenitore, senza aggiunta di tampone, refrigerati per non più di 72 ore o a temperatura ambiente per non più di 24 ore.

Trattare i coni ombelicali secondo una delle seguenti procedure:

a) Coprire i coni con un volume sufficiente (circa 40 ml) di tampone di estrazione (appendice 4) e porre in un agitatore rotativo (50-100 giri/m) per 4 ore a non più di 24 °C o per 16-24 ore se refrigerati.

b) Omogeneizzare i coni con un volume sufficiente (circa 40 ml) di tampone di estrazione (appendice 4) in un mixer (p. es. Waring o Ultra Thurax) o schiacciandoli in un sacchetto di macerazione monouso sigillato (p. es. Stomacher o Bioreba in polietilene di elevato spessore, 150 mm × 250 mm, sterile per irradiazione) usando un martello di gomma o uno strumento di macinazione appropriato (p. es. Homex).

NB: L'omogeneizzazione dei campioni per mezzo di un mixer comporta un rischio elevato di contaminazione incrociata. Prendere opportune precauzioni per evitare versamenti o generazione di aerosol nel corso del processo di estrazione. Assicurarsi che per ogni campione vengano usati lame e contenitori appena sterilizzati. Qualora si debba effettuare un saggio PCR, evitare i residui di DNA sui contenitori o gli apparecchi di macinazione. Per il saggio PCR si raccomanda lo schiacciamento in sacchetti monouso e l'impiego di provette monouso.

1.1.3. Far decantare il supernatante. Se eccessivamente torbido, chiarificare mediante centrifugazione a bassa velocità (non oltre 180 g per 10 minuti a una temperatura compresa tra 4 e 10 °C) o filtrazione sotto vuoto (40-100 µm), lavando il filtro con una dose supplementare (10 ml) di tampone di estrazione.

1.1.4. Concentrare la frazione batterica mediante centrifugazione a 7 000 g per 15 minuti (o 10 000 g per 10 minuti) a una temperatura compresa tra 4 e 10 °C e scartare il supernatante senza far muovere il sedimento.

1.1.5. Risospendere il sedimento in 1,5 ml di tampone per sedimento da centrifuga (appendice 4). Usare 500 µl per *R. solanacearum*, 500 µl per *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* e 500 µl a fini di riferimento. Aggiungere glicerolo sterile a una concentrazione finale del 10-25 % (v/v) ai 500 µl del quantitativo di riferimento e al resto del quantitativo da saggiare, mescolare nel vortex e conservare ad una temperatura compresa tra – 16 e – 24 °C (settimane) o tra – 68 e – 86° C (mesi). Mantenere i quantitativi da saggiare a una temperatura compresa tra 4 e 10 °C durante il saggio.

Non è consigliabile procedere a cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

Qualora sia richiesto un trasporto dell'estratto, la consegna deve essere effettuata in un contenitore refrigerato entro un massimo di 24-48 ore.

1.1.6. È indispensabile che tutti i campioni e i controlli positivi di *R. solanacearum* siano trattati separatamente per evitare contaminazioni. Ciò vale per i vetrini di immunofluorescenza e per tutti i saggi.

1.2. Saggi analitici

Cfr. il diagramma di flusso e la descrizione dei saggi e dei protocolli ottimizzati nelle relative appendici:

Isolamento selettivo (cfr. sezione VI.A.4)

Saggio IF (cfr. sezione VI.A.5)

Saggi PCR (cfr. sezione VI.A.6)

Saggio FISH (cfr. sezione VI.A.7)

Saggi ELISA (cfr. sezione VI.A.8)

Saggio biologico (cfr. sezione VI.A.9)

2. **Metodi dettagliati per il rilevamento e l'identificazione di R. *solanacearum* in campioni di piante di patata e di pomodoro o di altre piante ospiti asintomatiche**

2.1. Preparazione del campione

NB: Ai fini del rilevamento delle infezioni latenti di *R. solanacearum* si consiglia di saggiare campioni compositi. Il procedimento può essere applicato efficacemente a campioni compositi comprendenti fino a un massimo di 200 parti di fusto. Qualora si effettuino campagne di monitoraggio a fini di sorveglianza, esse devono basarsi su un campione statisticamente rappresentativo della popolazione di piante in esame.

2.1.1. Raccogliere segmenti di fusto lunghi 1-2 cm in un recipiente sterile chiuso secondo le procedure di campionamento di seguito indicate.

Piantine di pomodoro da vivaio. Servendosi di un coltello pulito e disinfettato, asportare un segmento di 1 cm dalla base di ciascun fusto, appena al di sopra del livello del suolo.

Piante di pomodoro coltivate in campo o in serra. Servendosi di un coltello pulito e disinfettato, asportare il germoglio laterale più basso da ciascuna piantina incidendo appena sopra il punto di giuntura con il fusto principale. Asportare il segmento di 1 cm più basso da ciascun germoglio laterale.

Altre piante ospiti. Servendosi di un coltello o di un paio di forbici da giardinaggio pulite e disinfettate, asportare un segmento di 1 cm dalla base di ciascun fusto, appena al di sopra del livello del suolo. Per *S. dulcamara* o altre piante ospiti che crescono in acqua, asportare segmenti di 1-2 cm dai fusti subacquei o dagli stoloni con radici acquatiche.

Si consiglia, nel campionare un determinato luogo, di saggiare un campione rappresentativo di almeno 10 piante per punto di campionamento di ciascuna pianta erbacea potenzialmente ospite. Il rilevamento del patogeno è più attendibile nella tarda primavera, in estate e in autunno, sebbene nel *Solanum dulcamara* che cresce lungo i corsi d'acqua le infezioni naturali possano essere rilevate durante tutto l'anno. Tra le piante ospiti note figurano le piante di patata spontanee, *Solanum dulcamara, S. nigrum, Datura stramonium* e altri membri della famiglia delle solanacee. Altre piante ospiti sono *Pelargonium* spp. e *Portulaca oleracea.* Tra le erbacee europee note o potenziali ospiti di popolazioni di *R. solanacearum* razza 3 biovar 2 nelle radici e/o nelle rizosfere, in particolari condizioni ambientali, figurano *Atriplex hastata, Bidens pilosa, Cerastium glomeratum, Chenopodium album, Eupatorium cannabinum, Galinsoga parviflora, Ranunculus scleratus, Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba, S. nutans, Tussilago farfara e Urtica dioica.*

NB: In questa fase può essere effettuato un esame visivo per individuare sintomi interni (colorazione vascolare o essudato batterico). Mettere da parte i segmenti di fusto che presentano sintomi sospetti e saggiarli individualmente (cfr. sezione II).

2.1.2. Disinfettare brevemente i segmenti di fusto con etanolo al 70 % e asciugare immediatamente tamponando con carta bibula. Trattare poi i segmenti di fusto con uno dei metodi seguenti:

a) coprire i segmenti con un volume sufficiente (circa 40 ml) di tampone di estrazione (appendice 4) e porre in un agitatore rotativo (50-100 rpm) per 4 ore a non più di 24 °C o per 16-24 ore se refrigerati; oppure

b) trattare i segmenti immediatamente schiacciandoli in un sacchetto di macerazione resistente (p. es. Stomacher o Bioreba) con un volume adeguato di tampone di estrazione (appendice 4) usando un martello di gomma o uno strumento di macinazione appropriato (p. es. Homex). Se ciò non fosse possibile, conservare i segmenti di fusto refrigerati per non più di 72 ore o a temperatura ambiente per non più di 24 ore.

2.1.3. Decantare il supernatante dopo averlo lasciato riposare per 15 minuti.

2.1.4. Non è in genere necessario procedere a un'ulteriore chiarificazione dell'estratto o concentrazione della frazione batterica, ma esse possono essere ottenute mediante filtrazione e/o centrifugazione secondo quanto descritto nelle sezioni III.1.1.3-1.1.5.

2.1.5. Dividere l'estratto del campione puro o concentrato in due parti uguali. Mantenerne una metà a 4-10 °C durante il saggio e conservare l'altra metà con glicerolo sterile al 10-25 % (v/v) a una temperatura compresa tra – 16 e – 24 °C (settimane) o tra 68 e 86 °C (mesi) qualora siano necessari ulteriori saggi.

2.2. Saggi analitici

Cfr. il diagramma di flusso e la descrizione delle prove e dei protocolli ottimizzati nelle relative appendici:

Isolamento selettivo (cfr. sezione VI.A.4)

Saggio IF (cfr. sezione VI.A.5)

Saggi PCR (cfr. sezione VI.A.6)

Saggio FISH (cfr. sezione VI.A.7)

Saggi ELISA (cfr. sezione VI.A.8)

Saggio biologico (cfr. sezione VI.A.9)

SEZIONE IV

1. **Schema di rilevamento e identificazione di R. solanacearum nell'acqua.**

Campione di acqua (1)

Concentrazione del patogeno (2)

SAGGIO DI SELEZIONE PRELIMINARE PRINCIPALE
Isolamento selettivo (3)
Saggi supplementari facoltativi: saggio biologico (4) / PCR post-arricchimento (5) / ELISA post-arricchimento (6)

Colonie con morfologia tipica (7) dopo l'isolamento

NO (8) → *R. solanacearum* non rilevato **Campione non contaminato da *R. solanacearum***

SÌ

Purificazione mediante subcoltura

SAGGI DI IDENTIFICAZIONE (9) — **PROVA DI PATOGENICITÀ** (10)

Entrambe le prove confermano l'identificazione della coltura pura come *R. solanacearum*

NO → **Campione non contaminato da *R. solanacearum***

SÌ

Campione contaminato da *R. solanacearum*

(1) Cfr. sezione IV.2.1 per le procedure di campionamento consigliate.

(2) I metodi di concentrazione del patogeno sono descritti nella sezione IV.2.1. La concentrazione aumenta le popolazioni sia dei patogeni che dei batteri saprofiti competitori ed è consigliabile solo a condizione che non causi inibizione del saggio di isolamento.

(3) Il saggio di isolamento selettivo è descritto nella sezione VI.A.4.

(4) Il saggio biologico è descritto nella sezione VI.A.9.

(5) I metodi per il PCR post-arricchimento sono descritti nella sezione VI.A.4.2 e nella sezione VI.A.6.

(6) I metodi per l'ELISA post-arricchimento sono descritti nella sezione VI.A.4.2 e nella sezione VI.A.8.

(7) La morfologia tipica della colonia è descritta nella sezione II.3.d.

(8) L'esito delle colture può essere compromesso a causa di una competizione o inibizione da parte di batteri saprofiti. Qualora si sospetti che l'affidabilità dell'isolamento possa essere compromessa dalla presenza di grandi popolazioni di saprofiti, è necessario ripetere i saggi di isolamento dopo avere diluito il campione in acqua sterile.

(9) È possibile ottenere un'identificazione affidabile di presunte colture pure di *R. solanacearum* utilizzando i saggi descritti nella sezione VI.B.

(10) La prova di patogenicità è descritta nella sezione VI.C.

2. Metodi di rilevamento e identificazione di *R. solanacearum* nell'acqua

Principi

Lo schema di rilevamento convalidato descritto nella presente sezione può essere usato per il rilevamento del patogeno in campioni di acque superficiali nonché per saggiare campioni di acque reflue o di reflui di lavorazione delle patate. Tuttavia è importante tener conto del fatto che la sensibilità prevista di rilevamento varia a seconda del substrato. La sensibilità del saggio di isolamento è condizionata dalle popolazioni di batteri saprofiti competitori, generalmente assai più numerose nelle acque reflue e nei reflui di lavorazione delle patate che nelle acque superficiali. Mentre nel caso delle acque superficiali la soglia di sensibilità dello schema sotto descritto arriva a 10^3 cellule per litro, nel caso delle acque reflue o dei reflui di lavorazione delle patate la soglia è assai superiore. È pertanto consigliabile effettuare i saggi sui reflui dopo eventuali trattamenti di depurazione (sedimentazione o filtrazione), che determinano una riduzione delle popolazioni di batteri saprofiti. Nel valutare l'affidabilità degli eventuali risultati negativi ottenuti si deve tener conto dei limiti di sensibilità dello schema diagnostico. Nonostante sia stato usato efficacemente in monitoraggi ed esami volti a stabilire la presenza o l'assenza del patogeno in acque superficiali, lo schema presenta alcuni limiti di cui è necessario tener conto nell'ambito di analoghi monitoraggi su acque reflue o su reflui di lavorazione delle patate.

2.1. Preparazione del campione

Nota:

- Il rilevamento di *R. solanacearum* nelle acque superficiali è più attendibile nella tarda primavera, in estate e in autunno, quando le temperature dell'acqua sono superiori a 15 °C.
- Prelevando i campioni in diversi momenti nel periodo summenzionato in punti di prelievo designati si potrà aumentare l'affidabilità del rilevamento e ridurre le conseguenze delle variazioni climatiche.
- Occorre tener conto degli effetti delle precipitazioni abbondanti e della geografia dei corsi d'acqua, al fine di evitare una eccessiva diluizione che potrebbe occultare la presenza del patogeno.
- Prelevare i campioni di acque superficiali in prossimità delle piante ospiti, se queste ultime sono presenti.

2.1.1. Nei punti di prelievo designati, riempire provette o bottiglie sterili monuso con campioni di acqua, attingendo a una profondità possibilmente superiore a 30 cm e a non oltre 2 metri dalla riva. Per le acque reflue o i reflui di lavorazione, prelevare i campioni nel punto di scarico delle acque. La dimensione massima raccomandata dei campioni per punto di prelievo è di 500 ml. Se si opta per campioni di dimensioni più piccole, è consigliabile prelevare i campioni ad almeno 3 riprese per punto di prelievo; ogni campione deve consistere di 2 sottocampioni duplicati di almeno 30 ml. Per monitoraggi estesi, selezionare almeno 3 punti di prelievo per 3 km di corso d'acqua e assicurarsi che vengano prelevati campioni anche dagli affluenti.

2.1.2. Trasportare i campioni in condizioni di oscurità e a bassa temperatura (4-10 °C) ed analizzarli entro 24 ore.

2.1.3. Se necessario la frazione batterica può essere concentrata usando uno dei seguenti metodi:

a) Centrifugare i sottocampioni di 30-50 ml a 10 000 g per 10 minuti (o a 7 000 g per 15 minuti), preferibilmente a una temperatura di 4-10 °C, scartare il sopranatante e risospendere il sedimento in 1 ml di tampone per sedimento (appendice 4).

b) Filtrare attraverso una membrana (dimensioni minime dei pori 0,45 µm) e successivamente lavare quest'ultima in 5-10 ml di tampone per sedimento, conservando le soluzioni di lavaggio. Questo metodo è consigliato per grandi quantità di acqua che contengono un numero ridotto di saprofiti.

In generale non si consiglia di effettuare la concentrazione sui campioni di acque reflue o di reflui di lavorazione della patata, giacché la presenza di popolazioni più numerose di batteri saprofiti competitori inibisce il rilevamento di *R. solanacearum*.

2.2. Saggi analitici

Cfr. il diagramma di flusso e la descrizione delle prove nelle relative appendici.

SEZIONE V

1. **Schema di rilevamento e identificazione di R. *solanacearum* nel terreno**

Campione di terreno (1)

Estrazione del patogeno

SAGGIO DI ISOLAMENTO PRINCIPALE
Isolamento selettivo (2)
Saggi supplementari facoltativi: PCR post-arricchimento (3) / saggio biologico (4)

Colonie con morfologia tipica (5) dopo l'isolamento

Tutti i saggi effettuati sono negativi

R. solanacearum non rilevato
Campione non contaminato da *R. solanacearum*

NO (6)

SÌ

Purificazione mediante subcoltura

SAGGI DI IDENTIFICAZIONE (7)

PROVA DI PATOGENICITÀ (8)

Entrambe le prove confermano l'identificazione della coltura pura come *R. solanacearum*

NO

Campione non contaminato da *R. solanacearum*

SÌ

Campione contaminato da *R. solanacearum*

(1) Cfr. sezione V.2.1 per le procedure di campionamento consigliate.

(2) Il saggio di isolamento selettivo è descritto nella sezione VI.A.4.

(3) I metodi per il saggio PCR post-arricchimentosono descritti nella sezione VI.A.4.2 e nella sezione VI.A.6.

(4) Il saggio biologico è descritto nella sezione VI.A.9.

(5) La morfologia tipica della colonia è descritta nella sezione II.3.d.

(6) L'esito delle colture può essere compromesso a causa di una competizione o inibizione da parte di batteri saprofiti. Qualora si sospetti che l'affidabilità dell'isolamento possa essere compromessa dalla presenza di grandi popolazioni di saprofiti, è necessario ripetere l'isolamento dopo avere ulteriormente diluito il campione.

(7) È possibile ottenere un'identificazione affidabile di presunte colture pure di *R. solanacearum* usando i saggi descritti nella sezione VI.B.

(8) La prova di patogenicità è descritta nella sezione VI.C.

2. **Metodi di rilevamento e identificazione di R. *solanacearum* nel terreno**

Principi

Lo schema di rilevamento convalidato, descritto nella presente sezione, viene usato per rilevare la presenza del patogeno nei campioni di terreno oltre che per saggiare campioni di scarti solidi di lavorazione della patata o di fanghi di depurazione. La sensibilità di tali metodi non risulta tuttavia sufficiente a garantire il rilevamento di popolazioni ridotte e/o irregolarmente distribuite di *R. solanacearum*, che possono essere presenti nei campioni naturalmente contaminati di questi materiali.

Nel valutare l'affidabilità degli eventuali risultati negativi ottenuti, come pure nell'ambito di monitoraggi volti a determinare la presenza o l'assenza del patogeno nel terreno o nei fanghi di depurazione, occorre tener conto dei limiti di sensibilità di questo schema diagnostico. La prova più affidabile per rilevare la presenza del patogeno nel terreno di un appezzamento è di piantare una pianta ospite sensibile e di monitorare l'eventuale infezione, sebbene anche con questo metodo possano sfuggire bassi livelli di contaminazione.

2.1. Preparazione del campione

2.1.1. Per la preparazione del campione di terra di un appezzamento attenersi alle norme di base usate per il campionamento dei nematodi. Prelevare 0,5-1 kg di terra per campione da 60 punti di prelievo per 0,3 ha, a una profondità di 10-20 cm (o in una griglia di 7 × 7metri). Se si sospetta la presenza del patogeno, aumentare il numero di punti di prelievo a 120 per 0,3 ha. Conservare i campioni a una temperatura di 12-15 °C prima di saggiare. Prelevare un totale di 1 kg di fanghi di depurazione e fanghi provenienti dalla lavorazione della patata da siti rappresentativi del volume totale dei fanghi da esaminare. Mescolare bene ciascun campione prima di saggiare.

2.1.2. Disperdere i sottocampioni di 10-25 g di terra o di fanghi con un agitatore rotativo (250 rpm) in 60-150 ml di tampone di estrazione (appendice 4) per un massimo di 2 ore. Se necessario aggiungere lo 0,02 % di Tween 20 e 10-20 g di ghiaia sterile per agevolare la dispersione.

2.1.3. Conservare la sospensione a 4 °C durante il saggio.

2.2. Saggi diagnostici

Cfr. il diagramma di flusso e la descrizione dei saggi nelle relative appendici.

SEZIONE VI

PROTOCOLLI OTTIMIZZATI PER IL RILEVAMENTO E L'IDENTIFICAZIONE DI R. *SOLANACEARUM*

A. *SAGGI DIAGNOSTICI E DI RILEVAMENTO*

1. **Prova di fuoriuscita dell'essudato dal fusto**

La presenza di *R. solanacearum* nei fusti di piante di patata e di pomodoro e in altre piante ospiti con sintomi di avvizzimento può essere rilevata presuntivamente mediante la seguente prova: tagliare il fusto appena sopra il livello del terreno; sospendere la superficie sezionata in una provetta di acqua limpida e in quiete; osservare se dopo pochi minuti si verifica la caratteristica fuoriuscita di filamenti biancastri di essudato batterico dai fasci fibrovascolari tagliati.

2. **Rilevamento dei granuli di poli-beta-idrossibutirrato**

1. Preparare uno striscio di essudato batterico proveniente da tessuto infetto o da una coltura di 48 ore su YPGA o SPA (appendice 2) su un vetrino da microscopio.

2. Preparare strisci di controllo positivo di un ceppo biovar 2 di *R. solanacearum* e, se ritenuto utile, uno striscio di controllo negativo di una specie batterica conosciuta come PHB-negativa.

3. Fare asciugare all'aria e passare la superficie inferiore di ciascun vetrino rapidamente sopra una fiamma per fissare gli strisci.

4. Colorare la preparazione con blu Nilo o nero Sudan e osservare al microscopio come descritto di seguito:

Colorazione blu Nilo

a) Bagnare il vetrino con una soluzione acquosa all'1 % di blu Nilo A e incubare per 10 minuti a 55 °C.

b) Far sgocciolare la soluzione colorante. Lavare rapidamente sotto un getto leggero di acqua corrente. Eliminare l'acqua in eccesso con carta bibula.

c) Bagnare lo striscio con una soluzione di acido acetico all'8 % e mantenere in incubazione per 1 minuto a temperatura ambiente.

d) Lavare rapidamente sotto un getto leggero di acqua corrente. Eliminare l'acqua in eccesso con carta bibula.

e) Riumidificare con una goccia d'acqua e applicare un vetrino coprioggetti.

f) Esaminare lo striscio colorato con un microscopio a epifluorescenza a 450 nm in olio da immersione a 600-1 000 ingrandimenti con un obiettivo a immersione in olio o acqua.

g) Osservare se vi sia una fluorescenza arancio vivo dei granuli PHB. Osservare anche a normale luce trasmessa per accertare che i granuli siano intracellulari e che la morfologia della cellula sia tipica di *R. solanacearum*.

Colorazione nero Sudan

a) Coprire ciascun vetrino con una soluzione allo 0,3 % di nero Sudan B in etanolo al 70 % e mantenere in incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti.

b) Far sgocciolare la soluzione colorante e lavare rapidamente in acqua corrente, eliminando l'acqua in eccesso con carta bibula.

c) Immergere rapidamente i vetrini in xilolo e asciugare tamponando con carta bibula. *Attenzione: lo xilolo è un prodotto nocivo, prendere opportune precauzioni per la sicurezza e operare in ambiente provvisto di cappa a tiraggio forzato.*

d) Coprire i vetrini con una soluzione acquosa di safranina allo 0,5 % (p/v) e lasciare per 10 secondi a temperatura ambiente. *Attenzione: la safranina è un prodotto nocivo, prendere opportune precauzioni per la sicurezza e operare in ambiente provvisto di cappa a tiraggio forzato.*

e) Lavare sotto un getto leggero di acqua corrente, asciugare tamponando con carta bibula e applicare un vetrino coprioggetti.

f) Esaminare gli strisci colorati con un microscopio ottico a luce trasmessa usando un obiettivo per immersione in olio a 1 000 ingrandimenti.

g) Osservare se i granuli di PHB nelle cellule di *R. solanacearum* si colorano di blu-nero e le pareti della cellula si colorano di rosa.

3. **Saggio sierologico di agglutinazione**

Il metodo migliore per osservare l'agglutinazione di cellule di *R. solanacearum* nell'essudato batterico o in estratti di tessuto sintomatico consiste nel servirsi di anticorpi convalidati (appendice 3) legati ad opportuni marcatori colorati quali cellule rosse di *Staphylococcus aureus* o particelle di lattice colorate. Se si utilizza un kit disponibile in commercio (appendice 3) seguire le istruzioni del fabbricante. In caso contrario seguire la seguente procedura:

a) Mescolare alcune gocce di una sospensione di anticorpi legati a particelle marcatrici ed essudato batterico (circa 5 μl di ciascuno) su vetrini a pozzetti multipli.

b) Preparare controlli positivi e negativi usando sospensioni di *R. solanacearum* biovar 2 e un ceppo eterologo.

c) Mescolare delicatamente per 15 secondi e osservare se si verifica l'agglutinazione nei campioni positivi.

4. **Isolamento selettivo**

4.1. Isolamento selettivo in piastra

NB: Prima di usare questo metodo per la prima volta, effettuare saggi preliminari per garantire il rilevamento riproducibile di almeno 10^3-10^4 unità formanti colonia di R. solanacearum per ml aggiunte a estratti dei campioni precedentemente risultati negativi.

Servirsi di un substrato selettivo adeguatamente convalidato come il substrato SMSA (modificato da Elphinstone *et al.*, 1996; cfr. l'appendice 2).

Occorre particolare attenzione anche per distinguere R. solanacearum da altri batteri che potrebbero sviluppare colonie sul terreno di coltura. Inoltre, le colonie di R. solanacearum possono presentare una morfologia atipica se le piastre sono sovrappopolate o se sono presenti anche batteri antagonisti. Qualora si sospettino effetti di competizione o antagonismo, il campione deve essere sottoposto a un saggio di tipo diverso.

Per ottenere la massima sensibilità di rilevamento con questo metodo è preferibile disporre di estratto del campione preparato al momento. Tuttavia, esso può essere eseguito anche su estratti conservati in glicerolo ad una temperatura compresa tra – 68 e – 86 °C.

Come controllo positivo, preparare diluizioni decimali di una sospensione di 10^6 cfu/ml di un ceppo virulento di biovar 2 di *R. solanacearum* (p. es. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Per evitare possibili contaminazioni, preparare i controlli positivi in un ambiente totalmente separato da quello dei campioni da saggiare.

Per ogni nuovo lotto di un substrato selettivo preparato, l'idoneità per lo sviluppo del patogeno andrebbe verificata prima che il lotto venga usato per saggiare campioni ordinari.

Saggiare il materiale di controllo con lo stesso metodo utilizzato per il/i campione/i.

4.1.1. Predisporre le sospensioni da inseminare sulle piastre a diluizioni tali da rendere minimo l'effetto di eventuali popolazioni batteriche saprofite formanti colonia associate al materiale. Inseminare 50-100 µl per piastra di estratto del campione e di ogni diluizione.

4.1.2. Mantenere le piastre in incubazione a una temperatura di 28 °C. Osservare le piastre dopo 48 ore e in seguito quotidianamente per un periodo fino a 6 giorni. Le colonie tipiche di *R. solanacearum* su SMSA sono di color bianco-latte, piatte, irregolari e fluide e dopo 3 giorni di incubazione sviluppano una colorazione da rosa a rosso sangue al centro, con striature interne e vortici (cfr. il sito web http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

NB: Su questo substrato possono formarsi colonie atipiche di *R. solanacearum*. Esse possono essere piccole, tonde, di un colore uniforme rosso e non fluide o soltanto in parte fluide e quindi difficili da distinguere dai batteri saprofiti formatori di colonie.

4.1.3. Purificare le presunte colonie di *R. solanacearum* dopo avere effettuato uno striscio o una diluizione in piastra su un mezzo nutritivo generale per ottenere colonie isolate (appendice 2).

4.1.4. Le colture possono essere conservate a breve termine in acqua sterile (pH 6-8, senza cloruri) a temperatura ambiente e in condizioni di oscurità, oppure a lungo termine in un mezzo crioprotettivo adeguato a una temperatura compresa tra – 68 e – 86 °C o liofilizzate.

4.1.5. Identificare le presunte colonie (cfr. sezione VI.B) ed effettuare un saggio di patogenicità (cfr. sezione VI.C).

Interpretazione del risultato dell'isolamento selettivo in piastra

L'isolamento selettivo in piastra è negativo se non si osservano colonie dopo sei giorni o se non si trovano colonie presunte tipiche di *R. solanacearum*, purché non si sospetti inibizione causata da competizione o antagonismo da parte di altri batteri e nel controllo positivo si trovino le caratteristiche colonie di *R. solanacearum*.

L'isolamento in piastra è positivo se vengono rilevate colonie presunte di *R. solanacearum*.

4.2. Procedura di arricchimento

Servirsi di un substrato di arricchimento convalidato come il brodo di Wilbrink modificato (cfr. appendice 2).

Questa procedura può essere usata per aumentare selettivamente le popolazioni di R. solanacearum *negli estratti del campione e per aumentare la sensibilità di rilevamento. La procedura è anche efficace per diluire gli inibitori della reazione PCR (1:100). Va notato comunque che l'arricchimento di* R. solanacearum *può essere compromesso a causa di una competizione o di un antagonismo da parte di organismi saprofiti che spesso vengono arricchiti allo stesso tempo. L'isolamento di* R. solanacearum *da brodi di coltura arricchiti può pertanto rivelarsi difficile. Inoltre, dato che le popolazioni di saprofiti sierologicamente affini possono aumentare, è consigliabile servirsi di anticorpi monoclonali specifici anziché di anticorpi policlonali qualora si debba effettuare il saggio ELISA.*

4.2.1. Per il PCR post-arricchimento trasferire 100 µl di estratto del campione in 10 ml di brodo di arricchimento (appendice 2), precedentemente frazionato in provette o bottiglie esenti da DNA. Per l'ELISA post-arricchimento possono essere aggiunte proporzioni maggiori di estratto del campione nel brodo (p. es. 100 µl in 1,0 ml di brodo di arricchimento).

4.2.2. Mantenere in incubazione per 72 ore a una temperatura di 27-30 °C in coltura agitata o statica, senza chiudere ermeticamente i tappi al fine di consentire l'aerazione.

4.2.3. Mescolare bene prima di usare nei saggi ELISA o PCR.

4.2.4. Trattare il brodo arricchito secondo lo stesso metodo usato per i campioni nei saggi precedenti.

NB: Se si prevede un'inibizione dell'arricchimento di *R. solanacearum* a causa di elevate popolazioni di determinati batteri saprofiti competitori, l'arricchimento dagli estratti dei campioni prima dell'eventuale centrifugazione o di altre procedure di concentrazione può dare risultati migliori.

5. **saggio IF**

Principi

Tenuto conto della sua comprovata capacità di garantire il rilevamento delle soglie richieste, si raccomanda l'uso del saggio IF come saggio di selezione preliminare principale.

Quando il saggio IF è usato come saggio di selezione preliminare principale e l'esito è positivo, occorre procedere ad un secondo saggio che può essere l'isolamento, la PCR o il FISH. Quando il saggio IF è usato come secondo saggio di selezione preliminare e l'esito è positivo, per completare l'analisi occorre procedere ad ulteriori saggi sulla base del diagramma di flusso.

NB: Servirsi di una fonte convalidata di anticorpi per *R. solanacearum* (cfr. il sito web http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Si consiglia di determinare il titolo di ciascun nuovo lotto di anticorpi. Il titolo si definisce come la più alta diluizione alla quale si verifica una reazione ottimale saggiando una sospensione contenente da 10^5 a 10^6 cellule per ml del ceppo omologo di *R. solanacearum* e usando un'appropriata diluizione del coniugato di isotiocianato di fluoresceina (FITC), secondo le istruzioni del produttore. Gli antisieri policlonali convalidati hanno tutti un titolo IF di almeno 1:2 000. Durante il saggio, gli anticorpi dovrebbero essere usati a diluizioni di lavoro prossime o corrispondenti a tale titolo.

Il saggio va effettuato su estratti di campione preparati al momento dell'uso. Se necessario, esso può essere eseguito efficacemente su estratti conservati in glicerolo ad una temperatura compresa tra – 68 e – 86 °C. Il glicerolo può essere rimosso dal campione mediante aggiunta di 1 ml di tampone per sedimento da centrifuga (appendice 4), ricentrifugazione per 15 minuti a 7 000 g e risospensione in un volume uguale di tampone per sedimento da centrifuga. Questa operazione non sempre è necessaria, soprattutto se i campioni vengono fissati ai vetrini mediante esposizione alla fiamma.

Preparare vetrini separati di controllo positivo del ceppo omologo o di qualunque altro ceppo di riferimento di *R. solanacearum* sospeso in estratto di patata, come specificato nell'appendice 3, e facoltativamente in tampone.

Ove possibile si dovrebbe usare tessuto contaminato naturalmente (conservato mediante liofilizzazione o congelamento a una temperatura compresa tra – 16 e – 24 °C) come controllo analogo nello stesso vetrino.

Come controllo negativo, usare aliquote di estratto di campione precedentemente risultato negativo per *R. solanacearum*.

I materiali di controllo positivi e negativi standardizzati che possono essere impiegati per questa prova figurano nell'appendice 3.

Usare vetrini per microscopio con più pozzetti, preferibilmente con 10 pozzetti di almeno 6 mm di diametro.

Eseguire il saggio sul materiale di controllo secondo lo stesso metodo usato per il/i campione/i.

5.1. Preparare i vetrini di saggio con uno dei seguenti procedimenti.

i) Per sedimenti contenenti una quantità relativamente ridotta di amido:

Trasferire con una pipetta sul primo pozzetto un volume standard misurato (15 µl è un valore adeguato per un pozzetto di 6 mm di diametro — aumentare il volume per pozzetti più grandi) di una diluizione 1:100 del sedimento risospeso. Successivamente trasferire con la pipetta un volume analogo di sedimento non diluito (1:1) sugli altri pozzetti della fila. La seconda fila può essere usata come duplicato o per un secondo campione, come illustrato nella figura 1.

ii) Per gli altri sedimenti:

Preparare diluizioni decimali (1:10 e 1:100) del sedimento risospeso nel tampone per sedimento. Trasferire con una pipetta su una fila di pozzetti un volume standard misurato (15 µl è un valore adeguato per un pozzetto di 6 mm di diametro — aumentare il volume per pozzetti più grandi) di sedimento risospeso e di ogni diluizione. La seconda fila può essere usata come duplicato o per un secondo campione, come illustrato nella figura 2.

5.2. Far evaporare il liquido delle goccioline a temperatura ambiente o mediante riscaldamento a una temperatura compresa tra 40 e 45 °C. Fissare le cellule batteriche al vetrino scaldandolo (15 minuti a 60 °C), passandolo alla fiamma, con etanolo al 95 % o seguendo le istruzioni specifiche fornite dal produttore degli anticorpi.

Se necessario, i vetrini fissati possono essere quindi conservati congelati in un contenitore ben asciutto per il tempo minimo necessario (fino a un massimo di tre mesi) prima di essere usati per ulteriori saggi.

5.3. Procedimento IF

i) Se il vetrino di saggio è stato preparato secondo il procedimento di cui al punto 5.1.i):

Preparare una serie di diluizioni decimali. Il primo pozzetto dovrebbe avere 1/2 del titolo (T/2), gli altri rispettivamente 1/4 del titolo (T/4), 1/2 del titolo (T/2), il titolo (T) e il doppio del titolo (2T).

ii) Se il vetrino di saggio è stato preparato secondo il procedimento di cui al punto 5.1.ii):

Preparare la diluizione di lavoro (WD) dell'anticorpo nel tampone IF. La diluizione di lavoro incide sulla specificità.

Figura 1. Preparazione del vetrino di saggio secondo i punti 5.1.i) e 5.3.i)

Diluizione del sedimento risospeso

	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	□ Diluizione del sedimento risospeso
(T = titolo)	T/2	T/4	T/2	T	2T	□ Diluizioni 1:2 dell'antisiero/anticorpo
Campione 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplicato del campione 1 o campione 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Figura 2. Preparazione del vetrino di saggio secondo i punti 5.1.ii) e 5.3.ii)

5.3.1. Disporre i vetrini su carta bibula umida. Coprire completamente ciascun pozzetto di saggio con la/le diluizione/i di anticorpo. Il volume di anticorpo messo su ciascun pozzetto deve essere almeno equivalente al volume di estratto.

In assenza di istruzioni specifiche da parte del fornitore degli anticorpi, si proceda come segue:

5.3.2. Mantenere in incubazione i vetrini su carta umida in un contenitore chiuso per 30 minuti a temperatura ambiente (18-25 °C).

5.3.3. Scuotere via le goccioline da ciascun vetrino e sciacquare accuratamente con tampone IF. Lavare immergendo per 5 minuti nel tampone IF-Tween (appendice 4) e poi nel tampone IF. Evitare la produzione di aerosol o il trasferimento di goccioline, che potrebbero provocare una contaminazione incrociata. Rimuovere accuratamente l'umidità in eccesso tamponando delicatamente con carta bibula.

5.3.4. Disporre i vetrini su carta bibula umida. Coprire i pozzetti di saggio con la diluizione di coniugato di FITC usato per determinare la concentrazione. Il volume di coniugato messo sui pozzetti deve essere identico al volume dell'anticorpo.

5.3.5. Mantenere in incubazione i vetrini su carta umida sotto copertura per 30 minuti a temperatura ambiente (18-25 °C).

5.3.6. Scuotere via le goccioline di coniugato dal vetrino. Sciacquare e lavare come in precedenza (paragrafo 5.3.3).

Rimuovere accuratamente l'umidità in eccesso.

5.3.7. Trasferire con una pipetta 5-10 µl di tampone glicerol-fosfato 0,1 M (appendice 4) o di un liquido di montaggio commerciale antiscolorimento in ciascun pozzetto e chiudere con un vetrino coprioggetti.

5.4. Lettura della colorazione IF

5.4.1 Esaminare i vetrini con un microscopio a epifluorescenza dotato di filtri idonei all'eccitazione del FITC, in olio o liquido di immersione, a 500-1 000 ingrandimenti. Esaminare attentamente i pozzetti lungo due diametri ortogonali e lungo il perimetro. Per i campioni che presentano assenza o un basso numero di cellule, osservare almeno 40 campi microscopici.

Esaminare anzitutto il vetrino del controllo positivo. Le cellule devono avere fluorescenza brillante ed essere interamente colorate al titolo o alla diluizione di lavoro determinati dell'anticorpo. Il saggio IF (sezione VI.A.5) deve essere ripetuto se la colorazione è anomala.

5.4.2. Verificare la presenza di cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica di *R. solanacearum* nei pozzetti di saggio dei vetrini (cfr. il sito web http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). L'intensità della fluorescenza deve essere equivalente al ceppo di controllo positivo con la stessa diluizione di anticorpi. Le cellule che presentano una colorazione incompleta o una debole fluorescenza devono essere ignorate.

In caso di sospetta contaminazione occorre ripetere il saggio. Tale sospetto può sorgere ad esempio se tutti i vetrini di un lotto presentano cellule positive dovute alla contaminazione del tampone o se vengono rilevate cellule positive (al di fuori dei pozzetti) sul rivestimento dei vetrini.

5.4.3. La prova di immunofluorescenza presenta alcuni problemi inerenti alla sua specificità. Nei precipitati di coni ombelicali e frammenti di fusto di patata è possibile che si manifesti la presenza di una popolazione di fondo di cellule fluorescenti con morfologia atipica e di batteri saprofiti a reazione incrociata simili per dimensioni e morfologia a *R. solanacearum*.

5.4.4. Considerare soltanto le cellule fluorescenti aventi dimensioni e morfologia tipica al titolo o alla diluizione di lavoro degli anticorpi secondo quanto indicato alla sezione 5.3.

5.4.5. Interpretazione della lettura della colorazione IF

i) Per ciascun campione in cui vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica, stimare il numero medio di cellule tipiche per campo microscopico e calcolare il numero di cellule tipiche per ml di sedimento di centrifuga risospeso (appendice 5).

La lettura della colorazione IF è positiva per i campioni che presentano almeno 5×10^3 cellule tipiche per ml di sedimento di centrifuga risospeso. Il campione si considera potenzialmente contaminato ed occorre procedere ad ulteriori saggi.

ii) La lettura della colorazione IF è negativa per i campioni che presentano meno di 5×10^3 cellule per ml di sedimento di centrifuga risospeso. Il campione si considera negativo e non sono necessari ulteriori saggi.

6. Saggi PCR

Principi

Quando il saggio PCR è usato come saggio di selezione preliminare principale e l'esito è positivo, occorre procedere all'isolamento o alla colorazione IF come secondo saggio di selezione preliminare obbligatorio. Quando il saggio PCR è utilizzato come secondo saggio di selezione preliminare e l'esito è positivo, per completare la diagnosi devono essere effettuati i saggi previsti dal diagramma di flusso.

Si raccomanda di usare questo metodo come saggio di selezione preliminare principale solo dopo aver acquisito una competenza specializzata.

NB: Un saggio preliminare con questo metodo dovrebbe permettere il rilevamento riproducibile di 10^3-10^4 cellule di *R. solanacearum* per ml aggiunte a estratti di un campione precedentemente risultato negativo. Può essere necessario condurre esperimenti di ottimizzazione per raggiungere livelli massimi di sensibilità e specificità in tutti i laboratori.

Servirsi di reagenti e protocolli PCR convalidati (cfr. appendice 6). Scegliere preferibilmente un metodo con controllo interno.

Prendere le opportune precauzioni per evitare la contaminazione del campione con il DNA bersaglio. Per ridurre al minimo la possibilità di contaminazione con il DNA bersaglio, il saggio PCR andrebbe eseguito da tecnici esperti, in laboratori di biologia molecolare specializzati.

I controlli negativi (per procedure di estrazione del DNA e PCR) devono essere sempre trattati come campione finale nel procedimento, al fine di evidenziare la presenza di eventuale disseminazione di DNA.

Nel saggio PCR devono essere inclusi i seguenti controlli negativi:

— estratto del campione precedentemente risultato negativo per *R. solanacaearum*;

— controlli del tampone usato per estrarre il batterio e il DNA dal campione;

— miscela di reazione PCR.

Devono essere inoltre inclusi i seguenti controlli positivi:

aliquote del precipitato risospeso a cui è stato aggiunto *R. solanacearum* (per la preparazione cfr. l'appendice 3B);

— una sospensione di 10^6 cellule per ml di *R. solanacearum* in acqua provenienti da un isolato virulento (p. es. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; cfr. l'appendice 3B).

— se possibile, servirsi anche di DNA proveniente da campioni di controllo positivi nella PCR.

Per evitare potenziali contaminazioni, preparare i controlli positivi in un ambiente separato da quello dei campioni da saggiare.

Nella misura del possibile, gli estratti del campione devono essere privi di residui di terra. In taluni casi può essere pertanto consigliabile, in previsione dell'utilizzo di protocolli PRC, preparare gli estratti a partire da patate lavate.

I materiali di controllo positivi e negativi standardizzati che possono essere impiegati per questa prova sono elencati nell'appendice 3.

6.1. Metodi di purificazione del DNA

Servirsi di campioni di controllo positivi e negativi, come sopra indicato (cfr. appendice 3).

Eseguire il saggio sul materiale di controllo secondo lo stesso metodo usato per il/i campione/i.

Esistono vari metodi per purificare il DNA bersaglio da substrati di campioni complessi, eliminando in tal modo gli inibitori della PCR e di altre reazioni enzimatiche e concentrando il DNA bersaglio nell'estratto del campione. Il metodo seguente è stato ottimizzato per l'impiego con i metodi PCR convalidati che figurano all'appendice 6.

a) Metodo di Pastrik (2000)

1) Trasferire con una pipetta 220 µl di tampone di lisi [NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (pH 8,0)] in una provetta Eppendorf da 1,5 ml.

2) Aggiungere 100 µl di estratto del campione e porre su una piastra riscaldante o a bagnomaria a 95 °C per 10 minuti.

3) Mettere la provetta in ghiaccio per 5 minuti.

4) Aggiungere 80 µl di soluzione madre di lisozima (50 mg di lisozima/ml in Tris HCl 10 mM, pH 8,0) e incubare a 37 °C per 30 minuti.

5) Aggiungere 220 µl di Easy DNA®, soluzione A (Invitrogen), mescolare bene nel vortex e incubare a 65 °C per 30 minuti.

6) Aggiungere 100 µl di Easy DNA®, soluzione B (Invitrogen), mescolare vigorosamente nel vortex fino a quando il precipitato non circoli liberamente nella provetta e il campione non presenti una viscosità uniforme.

7) Aggiungere 500 µl di cloroformio e mescolare nel vortex fino a quando la viscosità non diminuisca e la miscela non risulti omogenea.

8) Centrifugare a 15 000 g per 20 minuti a 4 °C per separare le fasi e formare l'interfase.

9) Trasferire la fase superiore in una nuova provetta Eppendorf.

10) Aggiungere 1 ml di etanolo al 100 % (– 20 °C), mescolare brevemente nel vortex e incubare in ghiaccio per 10 minuti.

11) Centrifugare a 15 000 g per 20 minuti a 4 °C ed eliminare l'etanolo dal precipitato.

12) Aggiungere 500 µl di etanolo all'80 % (– 20 °C) e mescolare capovolgendo la provetta.

13) Centrifugare a 15 000 g per 10 minuti a 4 °C, conservare il precipitato ed eliminare l'etanolo.

14) Lasciar seccare il precipitato all'aria o in una speed vac per DNA.

15) Risospendere il precipitato in 100 µl di UPW sterile e lasciare a temperatura ambiente per almeno 20 minuti.

16) Conservare a – 20 °C fino al momento di effettuare la PCR.

17) Isolare l'eventuale precipitato bianco mediante centrifugazione e usare 5 µl del supernatante contenente DNA per la PCR.

b) Altri metodi

È possibile applicare altri metodi di estrazione del DNA (p. es. Qiagen DNeasy Plant Kit), purché essi diano prova di un'efficacia equivalente nel purificare il DNA da campioni di controllo contenenti da 10^3 a 10^4 cellule del patogeno per ml.

6.2. PCR

6.2.1. Preparare la sequenza di nucleotidi di riferimento (primer) per la prova e il controllo, secondo i protocolli convalidati (sezione VI.A.6). Preparare una diluizione decimale dell'estratto di DNA proveniente dal campione (1:10 in UPW).

6.2.2. Preparare la miscela di reazione PCR in un ambiente privo di contaminazione secondo i protocolli pubblicati (appendice 6). Ove possibile si consiglia di usare un protocollo PCR multiplex che includa anche un controllo interno della PCR.

6.2.3. Aggiungere 2-5 µl di estratto di DNA per 25 µl di miscela di reazione PCR in provette da PCR sterili, conformemente ai protocolli PCR (appendice 6).

6.2.4. Includere un campione di controllo negativo contenente unicamente la miscela di reazione PCR e aggiungere la stessa fonte di UPW usata nella miscela PCR al posto del campione.

6.2.5. Porre le provette nello stesso termociclatore usato nei saggi preliminari ed eseguire il programma PCR opportunamente ottimizzato (appendice 6).

6.3. Analisi del prodotto della PCR

6.3.1. Separare gli ampliconi della PCR mediante elettroforesi in gel di agarosio. Far correre almeno 12 µl di miscela di reazione del DNA amplificato proveniente da ciascun campione mescolata con 3 µl di tampone di caricamento (appendice 6) in gel di agarosio al 2,0 % (p/v) in tampone TAE (tris-acetato-EDTA) (appendice 6) a una tensione di 5-8 V per cm. Usare un marcatore DNA adeguato, ad esempio un ladder a 100 bp.

6.3.2. Visualizzare le bande di DNA mediante colorazione con etidio bromuro (0,5 mg/l) per 30-60 minuti adottando opportune precauzioni nella manipolazione di questo mutagene.

6.3.3. Osservare il gel colorato con transilluminazione UV a onde corte (p. es. λ = 302 nm) per individuare prodotti della PCR amplificati delle dimensioni previste (appendice 6) e documentare i risultati.

6.3.4. Per ogni nuovo risultato positivo, verificare l'autenticità dell'amplicone della PCR effettuando un'analisi di restrizione enzimatica su un campione del DNA amplificato rimasto, incubando alla temperatura e per il tempo ottimale con un enzima e un tampone adeguati (cfr. appendice 6). Separare i frammenti digeriti mediante elettroforesi in gel di agarosio come in precedenza, osservare il profilo caratteristico di restrizione dei frammenti con transilluminazione UV previa colorazione con etidio bromuro e confrontare con il controllo positivo non digerito e digerito.

Interpretazione del risultato della colorazione PCR

Il saggio PCR è negativo se la presenza dell'amplicone PCR delle dimensioni previste, specifico per *R. solanacearum*, viene evidenziata in tutti i campioni del controllo positivo ma non nel campione in esame (in caso di PCR multiplex con primer di controllo interno specifici per le piante: un secondo prodotto PCR delle dimensioni previste deve essere amplificato con il campione in questione).

Il saggio PCR è positivo se si evidenzia l'amplicone PCR specifico per *R. solanacearum*, delle dimensioni previste e (ove necessario) con il profilo di restrizione caratteristico, a condizione che esso non si manifesti in nessuno dei campioni di controllo negativo. La conferma affidabile di un risultato positivo può essere inoltre ottenuta ripetendo la prova con una seconda serie di primer PCR (appendice 6).

NB: Si può sospettare un'inibizione della PCR se il campione di controllo positivo contenente *R. solanacearum* in acqua produce l'amplicone previsto ma i controlli positivi contenenti *R. solanacearum* in estratto di patata danno risultati negativi. Nei protocolli di multiplex PCR con controlli interni della PCR, l'inibizione della reazione è probabile quando non si ottiene nessuno dei due ampliconi.

Se l'amplicone previsto si manifesta in almeno uno dei controlli negativi si può sospettare una contaminazione.

7. **Saggio FISH**

Principi

Quando il saggio FISH è usato come primo saggio di selezione preliminare e l'esito è positivo, come secondo saggio di selezione preliminare obbligatorio dovrà essere effettuato il saggio di isolamento o la colorazione IF. Quando il saggio FISH è usato come secondo saggio di selezione preliminare e l'esito è positivo, per completare la diagnosi devono essere effettuati i saggi previsti dal diagramma di flusso.

NB: Usare oligosonde convalidate specifiche per *R. solanacearum* (appendice 7). Un saggio preliminare con questo metodo dovrebbe permettere il rilevamento riproducibile di almeno 10^3-10^4 cellule di *R. solanacearum* per ml aggiunte a estratti del campione precedentemente risultati negativi.

Il seguente procedimento andrebbe preferibilmente eseguito su estratti di campione preparati al momento dell'uso, ma può essere effettuato con successo su estratti conservati in glicerolo a una temperatura compresa tra 16 e – 24 °C o tra – 68 e – 86 °C.

Come controllo negativo, usare aliquote di estratto di campione precedentemente risultato negativo per *R. solanacearum*.

Come controllo positivo preparare sospensioni contenenti 10^5-10^6 cellule per ml di *R. solanacearum* biovar 2 (p. es. ceppo NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, cfr. appendice 3) in tampone fosfato 0,01 M provenienti da una coltura di 3-5 giorni. Preparare vetrini separati di controllo positivo del ceppo omologo o di qualunque altro ceppo di riferimento di *R. solanacearum* sospeso in estratto di patata, come specificato nell'appendice 3, punto B.

L'uso di un'oligosonda eubatterica marcata con FITC fornisce un controllo per il processo di ibridizzazione, poiché verranno colorati tutti gli eubatteri presenti nel campione.

I materiali di controllo positivi e negativi standardizzati che possono essere impiegati per questa prova sono elencati nell'appendice 3, punto A.

Eseguire il saggio sul materiale di controllo secondo lo stesso metodo usato per il/i campione/i.

7.1. Fissazione dell'estratto da patata

Protocollo secondo Wullings *et al.* (1998)

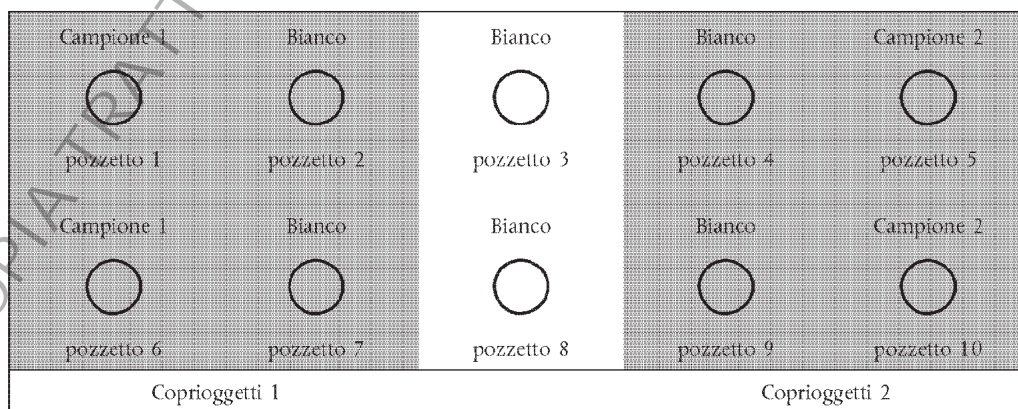
7.1.1. Preparare la soluzione fissativa (appendice 7).

7.1.2. Trasferire con una pipetta 100 µl di ciascun estratto del campione in una provetta Eppendorf e centrifugare per 7 minuti a 7 000 g.

7.1.3. Rimuovere il supernatante e sciogliere il precipitato in 200 µl di fissativo preparato meno di 24 ore prima. Mescolare nel vortex e incubare per 1 ora in frigorifero.

7.1.4. Centrifugare per 7 minuti a 7 000 g, rimuovere il supernatante e risospendere il precipitato in 75 µl di tampone fosfato 0,01 M (appendice 7).

7.1.5. Distribuire 16 µl delle sospensioni fissate su un vetrino multitest pulito, come indicato nella figura 7.1. Applicare 2 diversi campioni per vetrino, non diluiti, e utilizzarne 10 µl per fare una diluizione 1:100 (in tampone fosfato 0,01 M). Il resto della soluzione campione (49 µl) può essere conservato a – 20 °C previa aggiunta di 1 volume di etanolo al 96 %. Qualora il saggio FISH debba essere ripetuto, rimuovere l'etanolo mediante centrifugazione ed aggiungere un volume equivalente di tampone fosfato 0,01 M (mescolare nel vortex).

Figura 7.1 Schema del vetrino FISH.

7.1.6. Far asciugare i vetrini all'aria (o su un essiccatore per vetrini a 37 °C) e fissarli mediante esposizione alla fiamma.

A questo punto il procedimento può essere interrotto e l'ibridazione continuata il giorno successivo. I vetrini devono essere conservati asciutti e al riparo dalla polvere a temperatura ambiente.

7.2. Ibridazione

7.2.1. Disidratare le cellule in una serie graduata di etanolo (50 %, 80 % e 96 %), un minuto per ciascuna gradazione. Far asciugare i vetrini all'aria in un portavetrini.

7.2.2. Preparare una camera di incubazione umida coprendo il fondo di un recipiente ermetico con carta bibula o carta da filtro immersa in 1x hybmix (appendice 7). Procedere alla pre-incubazione nel forno di ibridazione a 45 °C per almeno 10 minuti.

7.2.3. Applicare 10 µl di soluzione di ibridazione (appendice 7) a 8 pozzetti (1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 e 10, cfr. figura 7.1) di ciascun vetrino, lasciando vuoti i due pozzetti centrali (3 e 8).

7.2.4. Applicare i coprioggetti (24 × 24 mm) al primo e agli ultimi 4 pozzetti evitando di imprigionare aria all'interno. Porre i vetrini nella camera umida preriscaldata e lasciar ibridare al buio per 5 ore nel forno a 45 °C.

7.2.5. Preparare 3 bicchieri contenenti 1 l di acqua molecolare Milli-Q, 1 l di 1x hybmix (334 ml di 3x hybmix e 666 ml di acqua Milli-Q) e 1 l di 1/8x hybmix (42 ml di 3x hybmix e 958 ml di acqua Milli-Q). Mettere in pre-incubazione a bagnomaria a 45 °C.

7.2.6. Togliere i coprioggetti dai vetrini e porre questi ultimi in un portavetrini.

7.2.7. Sciacquare via la sonda in eccesso mediante incubazione per 15 minuti nel bicchiere con 1x hybmix a 45 °C.

7.2.8. Trasferire il portavetrini in una soluzione di lavaggio costituita da 1/8 hybmix e lasciar incubare per altri 15 minuti.

7.2.9. Immergere rapidamente i vetrini in acqua Milli-Q e porli su carta da filtro. Rimuovere l'umidità in eccesso coprendo delicatamente la superficie con carta da filtro. Trasferire con una pipetta 5-10 µl di soluzione di montaggio anti-scolorimento (p. es. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA o equivalente) su ciascun pozzetto e applicare un largo coprioggetti (24 × 60 mm) sull'intero vetrino.

7.3. Lettura del saggio FISH

7.3.1. Osservare immediatamente i vetrini con un microscopio predisposto per l'epifluorescenza a 630 o 1 000 × ingrandimenti in olio da immersione. Con un filtro idoneo per l'isotiocianato di fluoresceina (FITC), le cellule eubatteriche del campione (inclusa la maggior parte delle cellule Gram-negative) appaiono colorate di un verde fluorescente. Usando un filtro per la tetrametilrodamina-5-isotiocianato, le cellule di *R. solanacaearum* marcate con Cy3 appaiono colorate di un rosso fluorescente. Confrontare la morfologia delle cellule con quella dei controlli positivi. Le cellule devono avere fluorescenza brillante ed essere interamente colorate. Il saggio FISH (sezione VI.A.7) deve essere ripetuto se la colorazione è anomala. Esaminare attentamente i pozzetti lungo due diametri ortogonali e lungo il perimetro. Per i campioni che presentano assenza o un basso numero di cellule, osservare almeno 40 campi microscopici.

7.3.2. Verificare la presenza di cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica di *R. solanacearum* nei pozzetti di saggio dei vetrini (cfr. il sito web http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). L'intensità della fluorescenza deve essere equivalente o maggiore rispetto a quella del ceppo di controllo positivo. Le cellule che presentano una colorazione incompleta o una debole fluorescenza devono essere ignorate.

7.3.3. In caso di sospetta contaminazione occorre ripetere il saggio. Tale sospetto può sorgere, ad esempio, se tutti i vetrini di un lotto presentano cellule positive dovute alla contaminazione del tampone o se vengono rilevate cellule positive (al di fuori dei pozzetti) sul rivestimento dei vetrini.

7.3.4. Il saggio FISH presenta una serie di inconvenienti legati alla sua specificità. Nei precipitati di coni ombelicali e frammenti di fusto di patata è possibile che si manifesti, sia pure con minor frequenza rispetto al saggio IF, la presenza di una popolazione di fondo di cellule fluorescenti con morfologia atipica e di batteri saprofiti a reazione incrociata simili per dimensioni e morfologia a *R. solanacearum*.

7.3.5. Considerare soltanto le cellule fluorescenti aventi dimensioni e morfologia tipiche.

7.3.6. Interpretazione del risultato del saggio FISH:

i) I risultati del saggio FISH sono considerati validi quando in tutti i controlli positivi e in nessuno dei controlli negativi si osservano cellule fluorescenti brillanti di colore verde con dimensioni e morfologia caratteristiche di *R. solanacearum* usando il filtro FITC e cellule fluorescenti brillanti di colore rosso usando il filtro rodamina. Per ciascun campione in cui vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica, stimare il numero medio di cellule tipiche per campo ottico e calcolare il numero di cellule tipiche per ml di sedimento centrifuga risospeso (appendice 4). I campioni che presentano almeno 5×10^3 cellule per ml di sedimento risospeso si considerano potenzialmente contaminati e rendono necessari ulteriori saggi. I campioni che presentano meno di 5×10^3 cellule per ml di sedimento risospeso si considerano negativi.

ii) Il saggio FISH è negativo quando usando il filtro rodamina non si osservano cellule fluorescenti brillanti di colore rosso con dimensioni e morfologia caratteristiche di *R. solanacearum*, a condizione che, con lo stesso filtro, tali cellule brillanti tipiche di colore rosso appaiano nelle preparazioni dei controlli positivi.

8. Saggi ELISA

Principi

A motivo della sua sensibilità piuttosto bassa, il saggio ELISA può essere usato unicamente come saggio facoltativo in aggiunta ai saggi IF, PCR o FISH. Quando si usa il saggio DAS-ELISA è obbligatorio l'arricchimento e l'impiego di anticorpi monoclonali (cfr. il sito web http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). L'arricchimento dei campioni prima del saggio ELISA può rivelarsi utile per aumentare la sensibilità del saggio, ma può avere insuccesso a causa della competizione da parte di altri organismi presenti nel campione.

NB: Servirsi di una fonte convalidata di anticorpi per R. solanacearum (cfr. il sito web http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Si consiglia di determinare il titolo di ciascun nuovo lotto di anticorpi. Il titolo si definisce come la più alta diluizione alla quale si verifica una reazione ottimale saggiando una sospensione contenente da 10^5 a 10^6 cellule per ml del ceppo omologo di *R. solanacearum* e usando opportuni coniugati di anticorpi secondari, secondo le istruzioni del produttore. Durante il saggio, gli anticorpi dovrebbero essere usati a diluizioni di lavoro prossime o corrispondenti al titolo della formulazione commerciale.

Determinare il titolo degli anticorpi su una sospensione di 10^5-10^6 cellule per ml del ceppo omologo di *R. solanacearum*.

Come controlli negativi, includere un estratto di campione precedentemente risultato negativo per *R. solanacearum* e una sospensione di un batterio non avente reazione incrociata in soluzione fisiologica tamponata al fosfato (PBS).

Come controllo positivo usare aliquote di estratto del campione precedentemente risultato negativo, miscelato con 10^3-10^6 cellule per ml di *R. solanacearum* biovar 2 (p. es. ceppo NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, vedi appendice 2 A e 2 B). Per confrontare i risultati su ciascuna piastra usare una sospensione standard di 10^5-10^6 cellule per ml in tampone PBS di *R. solanacearum*. Assicurarsi che i controlli positivi siano nettamente separati dal campione o dai campioni da saggiare sulla piastra da microtitolazione.

I materiali di controllo positivi e negativi standardizzati che possono essere impiegati per questo saggio sono elencati nell'appendice 3, punto A.

Saggiare il materiale di controllo con lo stesso metodo usato per il/i campione/i.

Sono stati convalidati due protocolli ELISA.

a) ELISA indiretto (secondo Robinson Smith *et al.*, 1995)

1) Usare aliquote di 100-200 µl di estratto del campione. (In alcuni casi, il riscaldamento a 100 °C per 4 minuti a bagnomaria o su una piastra riscaldante può ridurre i risultati non specifici).

2) Aggiungere un volume equivalente di tampone di rivestimento a doppia forza (appendice 4) e mescolare nel vortex.

3) Applicare aliquote di 100 µl ad almeno due pozzetti della piastra da microtitolazione (p. es. Nunc-Polysorp o equivalente) e mantenere in incubazione per 1 ora a 37 °C o per una notte a 4 °C.

4) Rovesciare la piastra con un colpo secco e dare dei colpetti per espellere gli estratti dai pozzetti. Lavare i pozzetti tre volte con PBS-Tween (appendice 4), lasciando l'ultima soluzione di lavaggio nei pozzetti per almeno 5 minuti.

5) Preparare la diluizione appropriata di anticorpi per *R. solanacearum* in un tampone di bloccaggio (appendice 4). Per gli anticorpi commerciali convalidati, usare le diluizioni raccomandate (di norma a concentrazione doppia rispetto al titolo).

6) Aggiungere 100 µl a ciascun pozzetto e mantenere in incubazione per 1 ora a 37 °C.

7) Rovesciare la piastra con un colpo secco, dare dei colpetti per espellere la soluzione di anticorpi dai pozzetti e lavare come in precedenza (punto 4).

8) Preparare la diluizione appropriata di coniugati secondari di anticorpi e di fosfatasi alcalina nel tampone di bloccaggio. Aggiungere 100 µl a ciascun pozzetto e mantenere in incubazione per 1 ora a 37 °C.

9) Rovesciare la piastra con un colpo secco, dare dei colpetti per espellere i coniugati di anticorpi dai pozzetti e lavare come in precedenza (punto 4).

10) Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato per la fosfatasi alcalina (appendice 4) a ciascun pozzetto. Mantenere in incubazione al buio a temperatura ambiente e leggere l'assorbanza a 405 nm a intervalli regolari entro un periodo di 90 minuti.

b) DASI-ELISA

1) Preparare la diluizione appropriata di immunoglobuline policlonali contro *R. solanacearum* in un tampone di rivestimento a pH 9,6 (appendice 4). Aggiungere 200 µl a ciascun pozzetto. Mantenere in incubazione per 4-5 ore a 37 °C o per 16 ore a 4 °C.

2) Lavare i pozzetti tre volte con PBS-Tween (appendice 4).

   Aggiungere ad almeno 2 pozzetti 190 µl di estratto del campione. Aggiungere anche i controlli positivi e negativi in due pozzetti per piastra. Mantenere in incubazione per 16 ore a 4 °C.

3) Lavare i pozzetti tre volte con PBS-Tween (appendice 4).

4) Preparare una diluizione appropriata di anticorpi monoclonali specifici di *R. solanacearum* in PBS (appendice 4) contenente anche lo 0,5 % di albumina di siero bovino (BSA) e aggiungere 190 µl a ciascun pozzetto. Mantenere in incubazione per 2 ore a 37 °C.

5) Lavare i pozzetti tre volte con PBS-Tween (appendice 4).

6) Preparare una diluizione appropriata di immunoglobuline anti-topo coniugate con fosfatasi alcalina in PBS. Aggiungere 190 µl a ciascun pozzetto. Mantenere in incubazione per 2 ore a 37 °C.

7) Lavare i pozzetti tre volte con PBS-Tween (appendice 4).

8) Preparare una soluzione di substrato della fosfatasi alcalina contenente 1 mg di fosfato di p-nitrofenil per ml di tampone substrato (appendice 4). Aggiungere 200 µl a ciascun pozzetto. Mantenere in incubazione al buio a temperatura ambiente e leggere l'assorbanza a 405 nm a intervalli regolari entro un lasso di tempo di 90 minuti.

Interpretazione dei risultati dei saggi ELISA

Il saggio Elisa è negativo se la densità ottica (D.O.) media dei pozzetti del campione duplicato è inferiore al doppio della D.O. del pozzetto di controllo negativo dell'estratto del campione, a condizione che la D.O. per tutti i controlli positivi sia superiore a 1,0 (dopo incubazione di 90 minuti con il substrato) e superiore al doppio della D.O. ottenuta per gli estratti del campione negativo.

Il saggio ELISA è positivo se la D.O. media dei pozzetti del campione duplicato è superiore al doppio della D.O. del pozzetto dell'estratto del campione negativo, a condizione che la D.O. per tutti i pozzetti di controllo negativo sia inferiore al doppio della D.O. dei pozzetti di controllo positivi.

Una lettura negativa del saggio ELISA nei pozzetti di controllo positivi indica che il saggio non è stato effettuato correttamente oppure che è stato inibito. Una lettura positiva del saggio ELISA nei pozzetti di controllo negativi indica che si è verificata una contaminazione incrociata o un legame di anticorpi non specifico.

9. **Saggio biologico**

NB: Un saggio preliminare svolto con questo metodo deve permettere il rilevamento riproducibile di 10^3-10^4 unità formanti colonia di *R. solanacearum* per ml aggiunte agli estratti dei campioni precedentemente risultati negativi (per la preparazione cfr. l'appendice 3).

La massima sensibilità di rilevamento si può avere usando estratto del campione preparato al momento e disponendo di condizioni di crescita ottimali. Tuttavia, il metodo può essere efficacemente applicato ad estratti conservati in glicerolo ad una temperatura compresa tra – 68 e – 86 °C.

Il protocollo descritto sotto si basa su Janse (1988):

9.1. Usare 10 piante di una cultivar di pomodoro adeguata (p. es. Moneymaker o cultivar di equivalente sensibilità constatata in saggi di laboratorio), ciascuna allo stadio di tre foglie vere. Per i dettagli relativi alla coltura cfr. l'appendice 8. Alternativamente usare le melanzane (p.es Black Beauty o cultivar di sensibilità equivalente), ma esclusivamente piante allo stadio di 2-3 foglie fino al pieno sviluppo della terza foglia vera. Si è osservato che nella melanzana i sintomi sono meno gravi e compaiono più lentamente. Ove possibile si raccomanda quindi di usare le piantine di pomodoro.

9.2. Distribuire 100 µl di estratto del campione tra le piantine da saggiare.

9.2.1. Inoculazione mediante siringa

Inoculare i fusti della piantina immediatamente sopra i cotiledoni usando una siringa con ago ipodermico (non inferiore a 23G). Distribuire il campione tra le piantine.

9.2.2. Inoculazione per incisione

Tenendo la pianta con due dita, versare mediante una pipetta una goccia (5-10 µl circa) del precipitato sospeso sul fusto tra i cotiledoni e la prima foglia.

Usando un bisturi sterile, praticare un'incisione diagonale di circa 1,0 cm e di profondità pari a circa 2/3 dello spessore del fusto. Il taglio deve iniziare dalla goccia di precipitato.

Sigillare il taglio con vaselina sterile mediante siringa.

9.3. Inoculare, con la stessa tecnica, 5 piantine con una sospensione acquosa di 10^5 10^6 cellule per ml preparata da una coltura di 48 ore di un ceppo virulento di *R. solanacearum* biovar 2 come controllo positivo e con un tampone per sedimento come controllo negativo. Separare le piante del controllo positivo e negativo dalle altre per evitare contaminazione.

9.4. Far crescere le piantine in locali di quarantena fino a un massimo di 4 settimane a una temperatura di 25-30 °C ad alta umidità relativa con annaffiature adeguate per evitare un eccesso di acqua o un avvizzimento causato da mancanza di acqua. Per evitare la contaminazione, incubare le piante per il controllo positivo e quelle per il controllo negativo su ripiani chiaramente separati all'interno di una serra o di una camera di crescita o, qualora si disponga di uno spazio limitato, garantire una rigida separazione fra i trattamenti. Se le piante usate per diversi campioni devono essere messe in incubazione insieme, separarle con schermi adeguati. Nel concimare, innaffiare, esaminare ed eseguire ogni atto, fare molta attenzione per evitare una contaminazione incrociata. È di fondamentale importanza tenere le serre e le camere di crescita libere da fitofagi che potrebbero trasmettere il batterio da un campione all'altro.

Vedere se si sviluppano sintomi di perdita di turgore, epinastia, clorosi e/o arresto della crescita.

9.5. Isolare dalle piante infette (cfr. sezione II.3) presunte colonie di *R. solanacearum* e identificarle in coltura pura (cfr. sezione VI.B).

9.6. Se dopo 3 settimane non si osservano sintomi, procedere a un saggio di isolamento/IF/PCR su un campione multiplo di sezioni di 1 cm di fusto prelevate da ciascuna pianta al di sopra del punto di inoculazione. Se la prova è positiva effettuare l'isolamento diretto in piastra (sezione 4.1).

9.7. Identificare presunte colture purificate di *R. solanacearum* (cfr. sezione VI.B).

Interpretazione dei risultati del saggio biologico

I risultati del saggio biologico possono considerarsi validi se le piante del controllo positivo presentano sintomi tipici, se il batterio può essere reisolato a partire da queste piante e se nessun sintomo viene riscontrato sui controlli negativi.

Il saggio biologico è negativo se le piante inoculate non risultano infettate da *R. solanacearum* e a condizione che quest'ultimo venga individuato nei controlli positivi.

Il saggio biologico è positivo se le piante inoculate risultano infettate da *R. solanacearum*.

B. *Saggi di identificazione*

Identificare le colture pure di presunti isolati di *R. solanacearum* utilizzando almeno due dei saggi seguenti, basati su principi biologici diversi.

Se opportuno, per ciascun saggio effettuato includere ceppi di riferimento conosciuti (appendice 3).

1. **Saggi di identificazione nutrizionali ed enzimatici**

Determinare le seguenti proprietà fenotipiche, sistematicamente presenti o assenti in *R. solanacearum* secondo i metodi di Lelliott e Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001)

Saggio	Risultato atteso
Produzione di pigmento fluorescente	
Inclusioni di poli-beta-idrossibutirrato	+
Saggio di metabolismo fermentativo/ossidativo (O/F)	O+/F–
Attività catalasica	+
Saggio dell'ossidasi di Kovacs	+
Riduzione dei nitrati	+
Utilizzazione del citrato	+
Crescita a 40 °C	–
Crescita in NaCl dell'1 %	+
Crescita in NaCl del 2 %	–
Attività arginina deidrolasica	–
Liquefazione della gelatina	–
Idrolisi dell'amido	–
Idrolisi dell'esculina	–
Produzione di levano	–

2. **Saggio IF**

2.1. Preparare una sospensione di circa 10^6 cellule per ml in tampone IF (appendice 4).

2.2. Preparare una serie di diluizioni 1:2 di un antisiero adeguato (cfr. il sito web http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

2.3. Applicare il procedimento IF (sezione VI.A.5).

2.4. Il risultato del saggio è positivo se il titolo IF della coltura in esame è equivalente a quello del controllo positivo.

3. **Saggio Elisa**

NB: Se si effettuano soltanto 2 saggi di identificazione, non utilizzare altri saggi sierologici in aggiunta a questo metodo.

3.1. Preparare una sospensione di circa 10^8 cellule per ml in 1X tampone PBS (appendice 4).

3.2. Effettuare una procedura ELISA adeguata con un anticorpo monoclonale specifico per *R. solanacearum*.

3.3. Il risultato del saggio è positivo se la lettura ELISA ottenuta dalla coltura è equivalente ad almeno la metà di quella del controllo positivo.

4. **Saggio PCR**

4.1. Preparare una sospensione di circa 10^6 cellule per ml in acqua distillata al grado molecolare sterile.

4.2. Riscaldare 100 µl della sospensione di cellule in provette chiuse su una piastra riscaldante o a bagnomaria a 100 °C per 4 minuti. I campioni possono quindi essere conservati a una temperatura compresa tra – 16 e – 24 °C fino al momento d'uso.

4.3. Applicare procedimenti PCR adeguati per amplificare gli ampliconi specifici per *R. solanacearum* [p. es. Seal *et al.* (1993); Pastrik e Maiss (2000); Pastrik *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999)].

4.4. L'identificazione di *R. solanacearum* è positiva se gli ampliconi della PCR presentano le stesse dimensioni e gli stessi polimorfismi di restrizione dei frammenti che si osservano nel ceppo di controllo positivo.

5. **Saggio FISH**

5.1. Preparare una sospensione di circa 10^6 cellule per ml in acqua ultrapura.

5.2. Applicare il procedimento FISH (sezione VI.A.7) con almeno 2 oligosonde specifiche per *R. solanacearum* (appendice 7).

5.3. Il risultato del saggio FISH è positivo se si ottengono le stesse reazioni sia nella coltura che nel controllo positivo.

6. **Profilo degli acidi grassi (FAP)**

6.1. Far crescere la coltura in esame su triptone-soia-agar (Oxoid) per 48 ore a 28 °C.

6.2. Applicare un procedimento FAP di tipo adeguato (Janse, 1991; Stead, 1992).

6.3. Il saggio FAP è positivo se il profilo della coltura in esame è identico a quello del controllo positivo. La presenza degli acidi grassi caratteristici 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH e 18:1 2OH e l'assenza di 16:0 3OH sono altamente indicative della presenza della specie *Ralstonia*.

7. **Metodi di caratterizzazione del ceppo**

La caratterizzazione del ceppo tramite uno dei seguenti metodi è consigliabile per ogni nuovo caso di isolamento di *R. solanacearum*.

Se appropriato, per ciascun saggio effettuato includere ceppi di riferimento conosciuti (appendice 3).

7.1. Determinazione della biovar

Ralstonia solanacearum è suddiviso in biovar in base alla capacità di utilizzare e/o ossidare tre disaccaridi e tre alcoli esosi (Hayward, 1964 e Hayward *et al.*, 1990). Il terreno nutritivo per il saggio della biovar è descritto nell'appendice 2. Il saggio può essere effettuato efficacemente inoculando per infissione i terreni con colture pure di isolati di *R. solanacearum* e mantenendo in incubazione a 28 °C. Se i terreni sono ripartiti in 96 pozzetti sterili di piastre da coltura cellulare (200 µl per pozzetto), un cambiamento di colore dal verde oliva al giallo osservato entro 72 ore indica che il saggio è positivo.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Impiego di:					
Maltosio	–	+	+	–	+
Lattosio	–	+	+	–	+
Cellobiosio D (+)	–	+	+	–	+
Mannitolo	–	–	+	+	+
Sorbitolo	–	–	+	+	–
Dulcitolo	–	–	+	+	–

Ulteriori saggi differenziano la biovar 2 in subfenotipi

	Biovar 2A (Diffuso in tutto il mondo)	Biovar 2A (Trovato in Cile e in Colombia)	Biovar 2T (Trovato in zone tropicali)
Utilizzo di trealosio	–	+	+
Utilizzo di *meso*-inositolo	+	–	+
Utilizzo di D-ribosio	–	–	+
Attività pectolitica ([1])	bassa	bassa	alta

([1]) Cfr. Lelliott e Stead (1987).

7.2. Impronte genomiche

La differenziazione molecolare dei ceppi nel complesso di *R. solanacearum* può essere effettuata mediante diverse tecniche, tra cui:

7.2.1. Analisi del polimorfismo della lunghezza del frammento di restrizione (RFLP) (Cook *et al.*, 1989).

7.2.2. PCR su sequenze ripetute usando i primer REP, BOX e ERIC (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).

7.2.3. Analisi del polimorfismo della lunghezza del frammento di amplificazione (AFLP) (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3. Metodi PCR

Primer specifici PCR (Pastrik *et al.*, 2002; cfr. appendice 6) possono essere usati per differenziare ceppi appartenenti alla divisione 1 (biovar 3, 4 e 5) e alla divisione 2 (biovar 1, 2A e 2T) di *R. solanacearum*, quali originariamente definite dall'analisi RFLP (Cook *et al.*, 1989) e dal sequenziamento del 16S rDNA (Taghavi *et al.*, 1996).

C. *Saggio di conferma*

La prova di patogenicità deve essere effettuata come conferma finale di una diagnosi di *R. solanacearum* e per valutare la virulenza delle colture identificate come *R. solanacearum*.

1) Preparare un inoculo di circa 10^6 cellule per ml da colture di 24-48 ore dell'isolato da saggiare e da un ceppo di controllo positivo di *R. solanacearum* (p. es. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; cfr. appendice 3).

2) Inoculare 5-10 piantine di pomodoro o melanzana di varietà sensibile allo stadio fogliare della terza foglia vera (sezione VI.A.9).

3) Mantenere in incubazione per un massimo di due settimane a temperatura tra 25 °C e 28 °C ad alta umidità relativa, innaffiando adeguatamente per evitare un accumulo d'acqua o uno stress dovuto a siccità. Nel caso di colture pure il tipico avvizzimento dovrebbe manifestarsi entro 14 giorni. Se, trascorso tale periodo, non si manifestano sintomi di infezione, non è possibile confermare che la coltura sia una forma patogena di *R. solanacearum*.

4) Tenere in osservazione per sintomi di avvizzimento e/o epinastia, clorosi e arresto della crescita.

5) Isolare da ciascuna pianta sintomatica una sezione di fusto prelevata circa 2 cm al di sopra del punto di inoculazione. Sminuzzarla e sospenderla in una piccola quantità di acqua distillata sterile o in tampone fosfato 50 mM (appendice 4). Inseminare piastre di terreno nutritivo appropriato avendo cura di distribuire quantità decrescenti sulla superficie (appendice 2), incubare per 48-72 ore a una temperatura di 28 °C e osservare il formarsi di colonie tipiche di *R. solanacearum*.

Appendice 1

Laboratori coinvolti nell'ottimizzazione e nella convalida dei protocolli

Laboratorio [1]	Ubicazione	Paese
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Vienna e Linz	Austria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgio
Plantedirektoratet	Lyngby	Danimarca
Central Science Laboratory	York	Inghilterra
Scottish Agricultural Science Agency	Edimburgo	Scozia
Laboratoire national de la protection des végétaux, unité de bactériologie	Angers	Francia
Laboratoire national de la protection des végétaux, station de quarantaine de la pomme de terre	Le Rheu	Francia
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Germania
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Germania
State Laboratory	Dublin	Irlanda
Dipartimento di scienze e tecnologie agroambientali	Bologna	Italia
Regione Veneto, Unità periferica per i servizi fitosanitari	Verona	Italia
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Paesi Bassi
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Paesi Bassi
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisbona	Portogallo
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Spagna
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Spagna
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Svezia

[1] Per prendere contatto con i ricercatori cfr. il sito web http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

Appendice 2

Terreni nutritivi per l'isolamento e la coltura di R. solanacearum

a) **Terreni nutritivi generali**

Agar nutritivo (NA)

Agar nutritivo (Difco)	23,0 g
Acqua distillata	1,00 l

Sciogliere gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Lievito peptone glucosio agar (YPGA)

Estratto di lievito (Difco)	5,0 g
Bacto-peptone (Difco)	5,0 g
D(+)-glucosio (monoidrato)	10,0 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Acqua distillata	1,00 l

Sciogliere gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Saccarosio-peptone-agar (SPA)

Saccarosio	20,0 g
Bacto-peptone (Difco)	5,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Acqua distillata	1,00 l

pH 7,2-7,4

Sciogliere gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Substrato al tetrazolio di Kelman

Casaminoacidi (Difco)	1,0 g
Bacto-peptone (Difco)	10,0 g
Destrosio	5,0 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Acqua distillata	1,00 l

Sciogliere gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Raffreddare a 50 °C e aggiungere una soluzione di cloruro di trifeniltetrazolio (Sigma), sterilizzata per filtrazione, fino a concentrazione finale di 50 mg/litro.

b) **Terreni di coltura selettivi convalidati**

Substrato SMSA (Englebrecht, 1994 modificato da Elphinstone *et al.*, 1996)

Substrato base

Casaminoacidi (Difco)	1,0 g
Bacto-peptone (Difco)	10,0 g
Glicerolo	5,0 ml
Bacto-agar (Difco) (*cfr. nota 2*)	15,0 g
Acqua distillata	1,00 l

Sciogliere gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Raffreddare a 50 °C e aggiungere soluzioni madre acquose dei seguenti ingredienti, sterilizzate per filtrazione, fino a ottenere le concentrazioni finali specificate:

Cristalvioletto (Sigma)	5 mg/l
Polimixina B solfato	(Sigma P-1004) 600 000 U(circa 100 mg)/l
Bacitracina (Sigma B-0125)	1 250 U (circa 25 mg)/l
Cloramfenicolo (Sigma C-3175)	5 mg/l
Penicillina G (Sigma P-3032)	825 U (circa 0,5 mg)/l
Cloruro di trifeniltetrazolo (Sigma)	50 mg/l

NB:

1. L'impiego di reagenti diversi da quelli indicati può interferire con la crescita di *R. solanacearum*.
2. Il Bacto-agar (Difco) può essere sostituito da Oxoid Agar #1. In questo caso la crescita di *R. solanacearum* sarà più lenta, ma anche la crescita di saprofiti competitori può essere ridotta. La formazione delle tipiche colonie di *R. solanacearum* può richiedere 1-2 giorni in più e la colorazione rossa può essere più attenuata e diffusa rispetto al Bacto-agar.
3. Un aumento della concentrazione di bacitracina a 2 500 U/l può ridurre le popolazione di batteri competitori senza condizionare la crescita di *R. solanacearum*.

Conservare i terreni di coltura e le soluzioni madri di antibiotici a 4 °C al buio e usarli entro un mese.

La piastre devono essere esenti da condensa superficiale prima dell'uso.

Evitare di far asciugare eccessivamente le piastre.

Il controllo della qualità dovrebbe essere fatto per ogni nuovo lotto di substrato inseminando sulle piastre una sospensione di una coltura di riferimento di *R. solanacearum* (cfr. appendice 3) e osservando la formazione delle tipiche colonie dopo un'incubazione di 2-5 giorni a 28 °C.

c) **Terreni di arricchimento convalidati**

Brodo SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996)

Preparare come per il terreno selettivo SMSA all'agar, eliminando il Bacto-agar e il cloruro di trifeniltetrazolo.

Brodo di Wilbrink modificato (Caruso *et al.*, 2002)

Saccarosio	10 g
Proteose peptone	5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4$	0,25 g
$NaNO_3$	0,25 g
Acqua distillata	1 l

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti e raffreddare a 50 °C.

Aggiungere le soluzioni madre di antibiotici come per il brodo SMSA.

Appendice 3

A. **Materiale di controllo standardizzato disponibile in commercio**

a) *Isolati batterici*

Si consiglia di usare i seguenti isolati batterici come materiale standard di riferimento per i controlli positivi (tabella 1) o durante l'ottimizzazione dei saggi per evitare reazioni incrociate (tabella 2). Tutti i ceppi sono disponibili in commercio presso:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), Central Science Laboratory, York, Regno Unito.
2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Paesi Bassi.
3. Collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP), INRA — Station de phytobactériologie, Angers, Francia.

Tabella 1. Colture SMT di riferimento di *R. solanacearum*

Codice NCPPB	SMT #	Altri codici	Paese di origine	Biovar
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egitto	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turchia	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Inghilterra	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Cipro	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Svezia	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgio	2
NCPPB 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Paesi Bassi	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	Francia	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Portogallo	2
NCPPB 4160	69	IVIA-1632-2	Spagna	2
NCPPB 4161	76	B3B	Germania	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	USA	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONg7	Costa Rica	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Colombia	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Perù	2T
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brasile	2T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Perù	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australia	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMIb2861	Sri Lanka	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Filippine	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Cina	5

(*) Utilizzare come ceppo di riferimento standard di *R. solanacearum* razza 3 biovar 2.

NB: L'autenticità dei ceppi summenzionati può essere garantita soltanto se gli stessi sono ottenuti da una coltura autentica di collezione.

Tabella 2. Lista di colture SMT autentiche di collezione di batteri sierologicamente o geneticamente affini da usare per rendere ottimali i saggi di rilevamento.

Codice NCPPB	SMT #	Altro codice	Identificazione
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	Bacillus polymyxa (1)
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	*Pseudomonas marginalis pv. marginalis* (1)
NCPPB 4164		CFBP 2227	*Burkholderia cepacia* (2)
NCPPB 4165	–	CFBP 2459	*Ralstonia pickettii* (2)
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	*Ralstonia pickettii* (1)
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	*Ralstonia*sp. (1)
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	*Burkholderia andropogonis* (1)
NCPPB 353	54	CFBP 3572	*Burkholderia caryophylli* (1)
NCPPB 945	55	CFBP 3569	*Burkholderia cepacia* (1)
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	*Burkholderia glumae* (1)
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	*Burkholderia plantarii* (1)
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	*Banana Blood Disease Bacterium* (1) (2) (3)
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	*Enterobacter* sp. (1)
NCPPB 4169	62	IPO 1695	*Enterobacter* sp. (1)
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	*Ochrobacterium anthropi* (1) (2)
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	*Curtobacterium* sp. (1) (2)
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	*Pseudomonas* sp. (1)
NCPPB 4173	–	PD 2318	*Aureobacterium* sp. (2)
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	*Flavobacterium* sp. (1) (2)

(1) Ceppo che può determinare una reazione incrociata nei saggi sierologici (IF e/o ELISA) con gli antisieri policlonali.
(2) Ceppo dal quale il prodotto della PCR può essere amplificato in alcuni laboratori di dimensioni simili a quelle previste usando i primer specifici OLI-1 e Y-2 (cfr. appendice 6).
(3) Potrebbe determinare una reazione incrociata nella maggior parte dei saggi, che tuttavia è stata riscontrata soltanto sulle banane in Indonesia.

b) *1Materiale di controllo standardizzato disponibile in commercio*

Il materiale di controllo standard sottoelencato è disponibile presso la collezione di colture NCPPB:

Sedimento di centrifuga liofilizzato estratto da 200 tuberi di patata sani come controllo negativo per tutti i saggi.

Sedimento di centrifuga liofilizzato estratto da 200 tuberi di patata sani contenenti da 10^3 a 10^4 e da 10^4 a 10^6 cellule di *R. solanacearum* biovar 2 (ceppo NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) come controlli positivi per i saggi sierologici e per i saggi PCR. Dato che il processo di liofilizzazione può condizionare la vitalità delle cellule, i sedimenti liofilizzati non si prestano ad essere usati come controlli standard nei saggi di isolamento o nei saggi biologici.

Sospensioni fissate in formalina di *R. solanacearum* biovar 2 (ceppo NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) a 10^6 cellule per ml come controlli positivi per i saggi sierologici.

B. **Preparazione di controlli positivi e negativi**

Preparare una coltura di 48 ore di un ceppo virulento di *R. solanacearum* razza 3 biovar 2 (p. es. ceppo NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) su substrato base SMSA e sospendere in tampone fosfato 10 mM per ottenere una densità cellulare di circa 2×10^8 cfu/ml. Questa concentrazione si ottiene comunemente con una sospensione lievemente torbida equivalente a una densità ottica di 0,15 a 600 nm.

Asportare il cono ombelicale di 200 tuberi di una varietà a buccia bianca in cui sia stata accertata assenza di *R. solanacearum*.

Trattare i coni ombelicali come di consueto e risospendere il sedimento in 10 ml.

Preparare 10 microprovette sterili da 1,5 ml con 900 µl del sedimento risospeso.

Trasferire 100 µl della sospensione di *R. solanacearum* nella prima microprovetta. Mescolare nel vortex.

Stabilire livelli decimali di contaminazione mediante ulteriori diluizioni nelle altre cinque microprovette.

Le sei microprovette contaminate verranno usate come controlli positivi. Le quattro microprovette non contaminate verranno utilizzate come controlli negativi. Etichettare le microprovette di conseguenza.

Preparare aliquote di 100 µl in microprovette sterili da 1,5 ml, ottenendo così 9 copie di ciascun campione di controllo. Conservare a una temperatura compresa fra 16 e 24 °C fino all'uso.

La presenza e la quantificazione di *R. solanacearum* nei campioni di controllo deve essere in primo luogo confermata dal saggio IF.

Per il saggio PCR procedere all'estrazione del DNA dai campioni di controllo positivi e negativi per ciascuna serie di campioni da saggiare.

Per i saggi IF e FISH effettuare prove sui campioni di controllo positivi e negativi per ciascuna serie di campioni da saggiare.

Per i saggi IF, FISH e PCR la presenza di *R. solanacearum* deve essere rilevata in almeno 10^6 e 10^4 cellule/ml dei controlli positivi e non deve essere rilevata in nessuno dei controlli negativi.

Appendice 4

Tamponi per le procedure dei saggi

INDICAZIONE GENERALE: i tamponi sterilizzati non aperti possono essere conservati fino a un anno.

1. **Tamponi per procedura di estrazione**

1.1. Tampone di estrazione (tampone fosfato 50 mM, pH 7,0)

Questo tampone è utilizzato per l'estrazione del batterio dai tessuti vegetali mediante omogeneizzazione o agitazione.

Na_2HPO_4 (anidro)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Acqua distillata	1,00 l

Sciogliere gli ingredienti, controllare il pH e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 min.

Possono risultare utili i seguenti componenti supplementari:

	Finalità	*Quantità (per l)*
Lubrol in scaglie	Deflocculante (*)	0,5 g
Antischiuma al silicone DC	Antischiumogeno (*)	1,0 ml
Pirofosfato tetrasodico	Antiossidante	1,0 g
Polivinilpirrolidone-40000 (PVP-40)	Legame con gli inibitori della PCR	50 g

(*) Da usare con il metodo di estrazione per omogeneizzazione.

1.2. Tampone per sedimento (tampone fosfato 10 mM, pH 7,2)

Questo tampone è impiegato per risospendere e diluire l'estratto di coni ombelicali di patate concentrato nel sedimento di centrifugazione.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
Acqua distillata	1,0 l

Sciogliere gli ingredienti, controllare il pH e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

2. **Tamponi per il saggio IF**

2.1. Tampone IF: soluzione fisiologica tamponata al fosfato (PBS) 10 mM, pH 7,2

Questo tampone viene impiegato per la diluizione degli anticorpi.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Acqua distillata	1,0 l

Sciogliere gli ingredienti, controllare il pH e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

2.2. Tampone IF-Tween

Questo tampone è usato per lavare i vetrini.

Aggiungere lo 0,1 % di Tween 20 al tampone IF.

2.3. Glicerolo tamponato al fosfato, pH 7,6

Questo tampone viene impiegato come liquido di montaggio sui pozzetti dei vetrini IF per incrementare la fluorescenza.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,15 g
Glicerolo	50 ml
Acqua distillata	100 ml

Soluzioni di montaggio antiscolorimento sono disponibili in commercio, p. es. Vectashield® (Laboratori Vector) o Citifluor® (Leica).

3. **Tamponi per il saggio ELISA indiretto**

3.1. Tampone di rivestimento a doppia forza (pH 9,6).

Na_2CO_3	6,36 g
$NaHCO_3$	11,72 g
Acqua distillata	1,00 l

Sciogliere gli ingredienti, controllare il pH e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Si può aggiungere solfito sodico (0,2 %) come antiossidante se necessario per impedire la formazione di composti aromatici ossidati.

3.2. Soluzione fisiologica tamponata al fosfato (PBS) 10X, pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	29,0 g
KCl	2,0 g
Acqua distillata	1,0 l

3.3. Tampone PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Acqua distillata	895 ml

3.4. Tampone bloccante (anticorpi) (da preparare al momento dell'uso)

10X PBS	10,0 ml
Polivinilpirrolidone-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Latte in polvere	0,5 g
Acqua distillata	Portare a 100 ml

3.5. Soluzione substrato fosfatasi alcalina, pH 9,8

Dietanolammina	97 ml
Acqua distillata	800 ml

Mescolare e regolare a pH 9,8 con HCl concentrato.

Portare a 1 litro con acqua distillata.

Aggiungere 0,2 g di $MgCl_2$.

Sciogliere due compresse da 5 mg di substrato per la fosfatasi (Sigma) per ogni 15 ml di soluzione.

4. Tamponi per il saggio DASI-ELISA

4.1. Tampone di rivestimento (pH 9,6)

Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
Acqua distillata	1 000 ml

Sciogliere gli ingredienti e controllare il pH.

4.2. Soluzione fisiologica tamponata al fosfato (PBS) pH 7,2-7,4

NaCl	80,0 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	4,0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	27,0 g
Acqua distillata	1 000 ml

4.3. Tampone PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Acqua distillata	950 ml

4.4. Tampone per il substrato (pH 9,8).

Dietanolammina	100 ml
Acqua distillata	900 ml

Mescolare e regolare a pH 9,8 con HCl concentrato.

———

Appendice 5

Determinazione del livello di contaminazione nei saggi IF e FISH

1. Conteggiare il numero medio di cellule fluorescenti tipiche per campo microscopico (c).

2. Calcolare il numero di cellule fluorescenti tipiche per pozzetto di vetrino da microscopio (C).

   $C = c \times S/s$

   in cui S = superficie del pozzetto del vetrino multiplo

   e s = superficie del campo dell'obiettivo

   $s = \pi i^2/4G^2K^2$ in cui i) = coefficiente di campo (dipende dal tipo di oculare e varia fra 8 e 24)

   K = coefficiente del microscopio (1 o 1,25)

   G = ingrandimento dell'obiettivo (100 ×, 40 × ecc.)

3. Calcolare il numero di cellule fluorescenti tipiche per ml di precipitato riportato in sospensione (N).

   $N = C \times 1\,000/y \times F$

   in cui y = volume del precipitato risospeso messo su ciascun pozzetto

   e F = fattore di diluizione del precipitato risospeso.

———

Appendice 6

Protocolli e reagenti PCR convalidati

NB: I saggi preliminari dovrebbero consentire il rilevamento riproducibile di 10^3-10^4 cellule di *R. solanacearum* per ml di estratto del campione.

I saggi preliminari, inoltre, non dovrebbero presentare falsi positivi in una serie di ceppi batterici selezionati (cfr. appendice 3).

1. Protocollo PCR di Seal *et al.* (1993)

1.1. Primer oligonucleotidici

Forward primer OLI-1 5′-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3′

Reverse primer Y-2 5′-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3′

Dimensioni attese degli ampliconi del DNA stampo di *R. solanacearum* = 288 bp

1.2. Miscela di reazione PCR

Reagente	Quantità per reazione	Concentrazione finale
UPW sterile	17,65 µl	
10X tampone PCR (¹) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
miscela d-nTP (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Primer Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq polimerasi (5 U/µl (¹))	0,1 µl	0,5 U
Volume del campione	2,0 µl	
Volume totale:	25 µl	

(¹) Il metodo è stato convalidato utilizzando Taq polimerasi Perkin Elmer (AmpliTaq) e Gibco BRL.

1.3. Condizioni di reazione della PCR

Eseguire il seguente programma:

1 ciclo di: i) 2 minuti a 96 °C (denaturazione del DNA stampo)

35 cicli di: ii) 20 secondi a 94 °C (denaturazione del DNA stampo)

iii) 20 secondi a 68 °C (appaiamento dei primer)

iv) 30 secondi a 72 °C (estensione della copia)

1 ciclo di: v) 10 minuti a 72 °C (estensione finale)

vi) mantenere a 4 °C

NB: Questo programma è ottimizzato per l'impiego con un termociclatore Perkin Elmer 9600. Qualora vengano usati altri modelli potrà essere necessario modificare la durata delle fasi ii), iii) e iv).

1.4. Analisi di restrizione enzimatica degli ampliconi

I prodotti della PCR amplificati a partire dal DNA di *R. solanacearum* producono uno specifico polimorfismo della lunghezza del frammento di restrizione dopo essere stati incubati a 37 °C con enzima *Ava* II.

2. **Protocollo PCR di Pastrik e Maiss (2000)**

2.1. Primer oligonucleotidici

Forward primer Ps-1 5′-agt cga acg gca gcg ggg g-3′

Reverse primer Ps-2 5′-ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca-3′

Dimensioni attese degli ampliconi del DNA stampo di *R. solanacearum* = 553 bp

2.2. Miscela di reazione PCR

Reagente	Quantità per reazione	Concentrazione finale
UPW sterile	16,025 µl	
Tampone 10X PCR ([1])	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frazione V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
miscela d-nTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq polimerasi (5 U/µl) ([1])	0,1 µl	0,5 U
Volume del campione	5,0 µl	
Volume totale:	25,0 µl	

([1]) I metodi sono stati convalidati usando Taq polimerasi Perkin Elmer (AmpliTaq) e Gibco BRL.

NB: Inizialmente ottimizzati per termociclatore MJ Research PTC 200 con Taq polimerasi Gibco.
È ugualmente possibile usare AmpliTaq e tampone Perkin Elmer alle stesse concentrazioni.

2.3. Condizioni di reazione della PCR

Eseguire il seguente programma:

1 ciclo di: i) 5 minuti a 95 °C (denaturazione del DNA stampo)

35 cicli di: ii) 30 secondi a 95 °C (denaturazione del DNA stampo)

iii) 30 secondi a 68 °C (appaiamento dei primer)

iv) 45 secondi a 72 °C (estensione della copia)

1 ciclo di: v) 5 minuti a 72 °C (estensione finale)

vi) mantenere a 4 °C

NB: Questo programma è ottimizzato per l'impiego con un termociclatore MJ Research PTC 200. Qualora vengano usati altri modelli potrà essere necessario modificare la durata delle fasi ii), iii) e iv).

2.4. Analisi di restrizione enzimatica degli ampliconi

I prodotti della PCR amplificati a partire dal DNA di *R. solanacearum* producono uno specifico polimorfismo della lunghezza del frammento di restrizione con l'enzima *Taq* I dopo essere stati incubati a 65 °C per 30 minuti. I frammenti di restrizione ottenuti dal frammento specifico di *R. solanacearum* hanno dimensioni di 457 bp e 96 bp.

3. **Protocollo PCR multiplex con controllo interno della PCR (Pastrik *et al.*, 2002)**

3.1. Primer oligonucleotidici

Forward primer RS-1-F 5′-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3′

Reverse primer RS-1-R 5′-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3′

Forward primer NS-5-F 5′-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3′

Reverse primer NS-6-R 5′-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3′

Dimensioni attese degli ampliconi del DNA stampo di *R. solanacearum* = 718 bp (set di primer RS)

Dimensioni attese degli ampliconi del controllo interno PCR 18S rRNA = 310 bp (set di primer NS)

3.2. Miscela di reazione PCR

Reagente	Quantità per reazione	Concentrazione finale
UPW sterile	12,625 µl	
10X tampone PCR ([1]) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frazione V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
miscela d-nTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer NS-5-F (10 µM) ([2])	0,15 µl	0,06 µM
Primer NS-6-R (10 µM) ([2])	0,15 µl	0,06 µM
Taq polimerasi (5 U/µl ([1]))	0,2 µl	1,0 U
Volume del campione	5,0 µl	
Volume totale:	25,0 µl	

([1]) I metodi sono stati convalidati usando Taq polimerasi Perkin Elmer (AmpliTaq) e Gibco BRL.

([2]) Le concentrazioni dei primer NS-5 F e NS-6-R sono state ottimizzate per l'estrazione dei coni ombelicali usando il metodo di omogeneizzazione e la purificazione del DNA secondo Pastrik (2000) (cfr. sezione VI.6.1.a). Sarà necessario riottimizzare le concentrazioni dei reagenti se sono impiegati metodi di estrazione mediante agitazione o altri metodi di isolamento del DNA.

3.3. Condizioni di reazione della PCR

Eseguire il seguente programma:

1 ciclo di:	i)	5 minuti a 95 °C (denaturazione del DNA stampo)
35 cicli di:	ii)	30 secondi a 95 °C (denaturazione del DNA stampo)
	iii)	30 secondi a 58 °C (appaiamento dei primer)
	iv)	45 secondi a 72 °C (estensione della copia)
1 ciclo di:	v)	5 minuti a 72 °C (estensione finale)
	vi)	mantenere a 4 °C

NB: Questo programma è ottimizzato per l'impiego con un termociclatore MJ Research PTC 200. Qualora vengano utilizzati altri modelli potrà essere necessario modificare la durata delle fasi ii), iii) e iv).

3.4. Analisi di restrizione enzimatica degli ampliconi

I prodotti della PCR amplificati a partire dal DNA di *R. solanacearum* producono uno specifico polimorfismo della lunghezza del frammento di restrizione con l'enzima *Bsm* I o un isoschizomero (p. es. Mva 1269 I) dopo essere stati incubati a 65 °C per 30 minuti.

4. **Protocollo PCR specifico per le biovar di R. solanacearum (Pastrik *et al.*, 2001)**

4.1. Primer oligonucleotidici

Forward primer Rs-1-F	5′-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3′
Reverse primer Rs-1-R	5′-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3′
Reverse primer Rs-3-R	5′-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3′

Dimensioni attese degli ampliconi del DNA stampo di *R. solanacearum*:

con Rs-1-F/Rs-1-R = 718 bp

con Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp

4.2. Miscela di reazione PCR

a) PCR specifica per le biovar 1/2

Reagente	Quantità per reazione	Concentrazione finale
UPW sterile	12,925 µl	
10X tampone PCR (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frazione V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
miscela d-nTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Primer Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq polimerasi (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Volume del campione	5,0 µl	
Volume totale:	25,0 µl	

(1) I metodi sono stati convalidati usando Taq polimerasi Perkin Elmer (AmpliTaq) e Gibco BRL.

b) PCR specifica per le biovar 3/4/5

Reagente	Quantità per reazione	Concentrazione finale
UPW sterile	14,925 µl	
10X tampone PCR (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frazione V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
miscela d-nTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Primer Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq polimerasi (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Volume del campione	5,0 µl	
Volume totale:	25,0 µl	

(1) I metodi sono stati convalidati usando Taq polimerasi Perkin Elmer (AmpliTaq) e Gibco BRL.

4.3. Condizioni di reazione della PCR

Eseguire il seguente programma sia per le reazioni specifiche per le biovar 1/2 che per quelle specifiche per le biovar 3/4/5:

1 ciclo di:	i)	5 minuti a 95 °C (denaturazione del DNA stampo)
35 cicli di:	ii)	30 secondi a 95 °C (denaturazione del DNA stampo)
	iii)	30 secondi a 58 °C (appaiamento dei primer)
	iv)	45 secondi a 72 °C (estensione della copia)
1 ciclo di:	v)	5 minuti a 72 °C (estensione finale)
	vi)	mantenere a 4 °C

NB: Questo programma è ottimizzato per l'impiego con un termociclatore MJ Research PTC 200. Qualora vengano usati altri modelli potrà essere necessario modificare la durata delle fasi ii), iii) e iv).

4.4. Analisi di restrizione enzimatica degli ampliconi

I prodotti della PCR amplificati a partire dal DNA di *R. solanacearum* usando i primer Rs-1-F e Rs-1-R producono uno specifico polimorfismo della lunghezza del frammento di restrizione con l'enzima *Bsm* I o un isoschizomero (p. es. Mva 1269 I) dopo essere stati incubati a 65 °C per 30 minuti. I prodotti della PCR amplificati a partire dal DNA di *R. solanacearum* usando i primer Rs-1-F e Rs-3-R non hanno punti di restrizione.

5. **Preparazione del tampone di caricamento**

5.1. Blu di bromofenolo (**soluzione madre** al 10 %)

Blu di bromofenolo	5 g
Acqua distillata (bidistillata)	50 ml

5.2. Tampone di caricamento

Glicerolo (86 %)	3,5 ml
Blu di bromofenolo (5,1)	300 μl
Acqua distillata (bidistillata)	6,2 ml

6. **10X tampone tris-acetato-EDTA (TAE), pH 8,0**

Tampone tris-acetato	48,40 g
Acido acetico glaciale	11,42 ml
EDTA (sale disodico)	3,72 g
Acqua distillata	1,00 l

Diluire a 1X prima dell'impiego.

Disponibile anche in commercio (p es. Invitrogen o equivalente).

Appendice 7

Reagenti convalidati per il saggio FISH

1. **Oligosonde**

Sonda specifica per *R. solanacearum* OLI-1-CY3: 5′-ggc agg tag caa gct acc ccc-3′

Sonda eubatterica non specifica EUB-338-FITC: 5′-gct gcc tcc cgt agg agt-3′

2. **Soluzione fissativa**

[ATTENZIONE! IL FISSATIVO CONTIENE PARAFORMALDEIDE, CHE È TOSSICA. INDOSSARE GUANTI E NON INALARE. SI CONSIGLIA DI LAVORARE SOTTO CAPPA CHIMICA].

i) Riscaldare 9 ml di acqua ultrapura (grado molecolare) (p es. acqua ultrapura, UPW) a circa 60 °C e aggiungere 0,4 g di paraformaldeide. La paraformaldeide si scioglie aggiungendo 5 gocce di NaOH 1N e mescolando con un agitatore magnetico.

ii) Regolare il pH a 7,0 aggiungendo 1 ml di tampone fosfato 0,1 M (PB; pH 7,0) e 5 gocce di HCl 1N. Controllare il pH con cartine indicatrici e, se necessario, regolare con HCl o NaOH. *[ATTENZIONE! NON USARE UN MISURATORE DI PH IN SOLUZIONI CONTENENTI PARAFORMALDEIDE].*

iii) Filtrare la soluzione attraverso una membrana con porosità 0,22 μm e conservare al riparo dalla polvere a 4 °C fino all'uso successivo.

3. **3X Hybmix**

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (sterilizzato per filtrazione e autoclavato)	15 mM

Diluire a 1X come prescritto.

4. **Soluzione di ibridazione**

1 X Hybmix	
Sodio dodecil solfato (SDS)	0,01 %
Formammide	30 %
Sonda EUB 338	5 ng/μl
Sonda OLI-1 o OLI-2	5 ng/μl

Preparare quantità di soluzione d'ibridazione secondo i calcoli di cui alla tabella 1. Per ciascun vetrino (contenente 2 campioni diversi in duplicato) sono necessari 90 μl di soluzione di ibridazione. *IMPORTANTE: LA FORMAMMIDE È ESTREMAMENTE TOSSICA, INDOSSARE GUANTI E PRENDERE OPPORTUNE PRECAUZIONI!*

Tabella 1. Quantità consigliate per la preparazione della miscela di ibridazione

Numero di vetrini:	1	4	6	8	10
UPW sterile	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x Hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formammide	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Sonda EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Sonda OLI-1 o OLI-2 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Volume totale (μl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

NB: Conservare al buio a una temperatura di – 20 °C tutte le soluzioni contenenti oligosonde sensibili alla luce. Durante l'impiego proteggere dalla luce solare diretta o dalla luce elettrica.

5. **Tampone fosfato 0,1 M, pH 7,0**

Na_2HPO_4	8,52 g
KH_2PO_4	5,44 g
Acqua distillata	1,00 l

Sciogliere gli ingredienti, controllare il pH e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Appendice 8

Condizioni di coltura per le melanzane e i pomodori

Seminare i semi di pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) o di melanzana (*Solanum melongena*) in terra da semina pastorizzata. Trapiantare le piantine con cotiledoni completamente sviluppati (10-14 giorni) in terra da vaso pastorizzata.

Le melanzane o i pomodori dovrebbero essere coltivati in una serra nelle seguenti condizioni ambientali prima dell'inoculazione:

Luce:	14 ore o lunghezza naturale del giorno se maggiore
Temperatura:	diurna: da 21 a 24 °C notturna: da 14 a 18 °C
Varietà di pomodoro sensibile:	"Moneymaker"
Varietà di melanzana sensibile:	"Black Beauty"
Fornitori:	cfr. il sito web http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172: 762-770.
2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al*. Official Journal of the European Communities L235, 1-39.
3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. European Journal of Plant Pathology 105; 373-380.
4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J.L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. Applied and Environmental Microbiology, 68, 3634-3638.
5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Molecular Plant-Microbe Interactions 1:113-121.
6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26; 663-678.
7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) Bacterial Wilt Newsletter 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27; 265-277.
9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 69; 269-280.
10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. J. Phytopathology 146; 379-384.
11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 18, 343-351.
12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacaerum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.
13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44; 693-695.
14. Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne *et al*., (eds). Klewer Academic Publishers. pp. 117-121.
17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60, 2286-2295.
18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology 85; 528-536.
19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F Wang, T.-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5; 19-33.
20. Pastrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. J. Phytopathology 148; 619-626.
21. Pastrik, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. European Journal of Plant Pathology 108, 831-842.
22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. Food and Agricultural Immunology 7, 67-79.

23. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.

24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum, Pseudomonas syzygii, Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.

25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61; 4262-4268.

26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.

27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysiss of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum, Pseudomonas syzygii,* and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.

28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.

29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative flourogenic 5' nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66; 2853-2858.

30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of R. *solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4546-4554.

———

ALLEGATO III

1. Per ogni caso sospetto per il quale sia stato rilevato un risultato positivo nel saggio/nei saggi di selezione preliminare secondo i metodi di cui all'allegato II per il materiale vegetale elencato e per il quale si attenda la conferma o la smentita attraverso i suddetti metodi, è necessario mantenere e conservare in condizioni adeguate:

— tutti i campioni di tuberi e, ove possibile, tutti i campioni di piante,

— ogni estratto residuo ed ogni materiale supplementare (p. es.: vetrini di immunofluorescenza) preparato per i saggi di selezione preliminare,

e

— tutta la documentazione pertinente fino al termine delle prove condotte secondo i suddetti metodi.

La conservazione dei tuberi consentirà di effettuare, ove necessario, prove varietali.

2. Qualora venga confermata la presenza dell'organismo nocivo, è necessario mantenere e conservare in condizioni adeguate:

— il materiale di cui al paragrafo 1,

— un campione del materiale di pomodoro o di melanzana infetto inoculato con l'estratto di tubero o di pianta, ove necessario,

e

— la coltura isolata dell'organismo nocivo per almeno un mese dalla procedura di notifica di cui all'articolo 5, paragrafo 2.

ALLEGATO IV

Gli accertamenti di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto i), comprendono, secondo il caso, i seguenti elementi:

i) luoghi di produzione

— dove sono o sono state coltivate patate in relazione clonale con patate risultate infette dall'organismo nocivo,

— dove sono o sono stati coltivati pomodori che provengono dalla stessa fonte dei pomodori risultati infetti dall'organismo nocivo,

— dove sono o sono stati coltivati patate o pomodori posti sotto controllo ufficiale per sospetta presenza dell'organismo nocivo,

dove sono o sono state coltivate patate in relazione clonale con patate coltivate in luoghi di produzione risultati contaminati da parte dell'organismo nocivo,

— dove vengono coltivati patate o pomodori e situati in vicinanza di luoghi di produzione contaminati, compresi quelli dove vengono condivisi attrezzature di produzione e impianti, sia direttamente, sia attraverso un imprenditore comune,

— dove l'irrigazione o l'irrorazione siano praticate con acque superficiali originarie di qualunque fonte confermata o sospetta di contaminazione da parte dell'organismo nocivo,

— che per l'irrigazione o l'irrorazione condividono la fonte delle acque superficiali con luoghi di produzione dove la contaminazione da parte dell'organismo nocivo è stata confermata o si sospetta,

— che sono inondati o sono stati inondati con acque superficiali per le quali è stata confermata o si sospetta la contaminazione da parte dell'organismo nocivo,

e

ii) acque superficiali impiegate per l'irrigazione, l'irrorazione o l'inondazione di uno o più terreni o luoghi di produzione in cui è confermata la contaminazione da parte dell'organismo nocivo.

———

ALLEGATO V

1. Per determinare l'entità della contaminazione probabile di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto iii), e lettera c), punto iii), è necessario tener conto dei seguenti elementi:

   — materiale vegetale elencato coltivato in un luogo di produzione dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii),

   — luoghi di produzione associati al ciclo produttivo del materiale vegetale elencato dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii), compresi quelli dove vengono condivisi macchinari e dispositivi di produzione direttamente o attraverso un imprenditore comune,

   — materiale vegetale elencato prodotto nel luogo o nei luoghi di produzione di cui al precedente trattino, o presenti in tali luoghi di produzione nel periodo in cui il materiale vegetale elencato dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii), era presente nei luoghi di produzione di cui al primo trattino,

   — locali adibiti alla manipolazione del materiale vegetale elencato proveniente dai luoghi di produzione di cui sopra,

   — macchinari, veicoli, contenitori, magazzini, o relative parti, e qualsiasi altro oggetto, compresi i materiali d'imballaggio, che possano essere venuti a contatto con il materiale vegetale elencato dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii),

   — materiale vegetale elencato immagazzinato o entrato in contatto con una qualsiasi delle strutture o degli oggetti elencati nel precedente trattino prima della pulizia e della disinfezione di tali strutture od oggetti,

   — in esito agli accertamenti ed alle prove di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto i), nel caso delle patate, tuberi o piante con una relazione clonale parentale o collaterale e, nel caso dei pomodori, piante con la stessa fonte del materiale vegetale elencato dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii), e per le quali, malgrado i risultati negativi nei saggi per l'individuazione dell'organismo nocivo, la contaminazione risulti probabile per legami di carattere clonale (per verificare l'identità di tuberi o piante contaminati ed aventi una relazione clonale può essere effettuata una prova varietale),

   — luoghi di produzione del materiale vegetale di cui al precedente trattino,

   — luoghi di produzione del materiale vegetale elencato, che per l'irrigazione o l'irrorazione impiegano acque dichiarate contaminate ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera c), punto ii),

   materiale vegetale elencato prodotto in appezzamenti inondati con acque superficiali per le quali è confermata la contaminazione.

2. Per determinare la potenziale disseminazione di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto iv), e lettera c), punto iii), è necessario tenere conto dei seguenti elementi:

   i) nei casi di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto iv):

      — la vicinanza di altri luoghi di produzione in cui è coltivato il materiale vegetale elencato,

      — produzione e utilizzo comuni di scorte di tuberi-seme di patate,

      — luoghi di produzione che per l'irrigazione o l'irrorazione del materiale vegetale elencato impiegano acque superficiali, nei casi in cui esiste od è esistito un rischio di fughe di acque superficiali o di inondazione dal luogo o dai luoghi di produzione dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii);

ii) nei casi in cui le acque superficiali sono state dichiarate contaminate ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera c), punto ii):

— luogo o luoghi di produzione del materiale vegetale elencato adiacenti alle acque superficiali dichiarate contaminate, o a rischio di inondazione da parte delle stesse,

— bacini di irrigazione separati associati alle acque superficiali dichiarate contaminate,

— corpi idrici comunicanti con le acque superficiali dichiarate contaminate, tenuto conto di quanto segue:

— la direzione e la portata delle acque dichiarate contaminate,

— la presenza di solanacee selvatiche ospiti.

3. La notifica di cui all'articolo 5, paragrafo 2, primo comma, va fornita con le seguenti modalità:

— non appena la presenza dell'organismo nocivo è stata confermata da prove di laboratorio che impiegano i metodi di cui all'allegato II, indicare almeno:

— per le patate:

a) la varietà della partita,

b) il tipo (da consumo, da semina, ecc.) e all'occorrenza la categoria dei tuberi-seme;

— per le piante di pomodoro, la denominazione varietale della partita e all'occorrenza la categoria;

— fatte salve le disposizioni per la notifica di una manifestazione sospetta ai sensi dell'articolo 4, paragrafo 3, ove sussista un rischio di contaminazione di materiale vegetale elencato proveniente da o diretto in altri Stati membri lo Stato membro nel quale è stata confermata la manifestazione notifica immediatamente allo Stato o agli Stati membri interessati le informazioni che consentano di rispettare l'articolo 5, paragrafo 3, ossia:

a) la varietà della partita di patate o di pomodori,

b) il nominativo e l'indirizzo dell'esportatore e del destinatario,

c) la data di consegna della partita di patate o di pomodori,

d) l'entità della partita di patate o di pomodori consegnata,

e) una copia del passaporto delle piante o almeno il numero dello stesso nonché all'occorrenza il numero di registrazione del coltivatore o del grossista e una copia dell'avviso di consegna.

La Commissione va immediatamente informata dell'avvenuta trasmissione di tali informazioni.

4. I dati della notifica supplementare di cui all'articolo 5, paragrafo 2, primo comma, vanno forniti con le seguenti modalità:

una volta concluse le indagini, indicare per ogni caso:

a) la data di conferma della notifica,

b) una breve descrizione dell'indagine effettuata per identificare la fonte e la possibile diffusione della contaminazione, incluso il livello del campionamento effettuato,

c) informazioni sul le fonti identificate o presunte della contaminazione,

d) dati sull'estensione della contaminazione dichiarata, compreso il numero di luoghi di produzione e, per le patate, il numero di partite, con l'indicazione della varietà e, nel caso dei tuberi-seme, della categoria,

e) particolari relativi alla delimitazione della zona, incluso il numero di luoghi di produzione non dichiarati contaminati, ma compresi nella zona,

f) particolari relativi alle acque dichiarate, compresi il nome e l'ubicazione del corpo idrico e la portata della dichiarazione o del divieto di irrigazione,

g) per ogni spedizione o partita di piante di pomodoro dichiarate contaminate, i certificati di cui all'articolo 13, paragrafo 1, punto ii), della direttiva 2000/29/CE ed il numero di passaporto, a norma dell'elenco di cui all'allegato V, parte A, sezione I, paragrafo 2.2, della direttiva 2000/29/CE,

h) ogni altra informazione eventualmente richiesta dalla Commissione sulla confermata comparsa della malattia.

———

ALLEGATO VI

1. Le disposizioni di cui all'articolo 6, paragrafo 1, sono le seguenti:

   — impiego per l'alimentazione animale, previo idoneo trattamento termico, tale che non sussista alcun rischio di sopravvivenza dell'organismo nocivo,

   o

   — smaltimento in un sito apposito, ufficialmente approvato e destinato a tale scopo, in cui non siano identificabili rischi di dispersione dell'organismo nell'ambiente, ad esempio in seguito ad infiltrazione nel terreno agricolo o contatti con sorgenti d'acqua che potrebbero essere usate per l'irrigazione di terreni agricoli,

   o

   — incenerimento,

   o

   — destinazione alla trasformazione industriale, attraverso la consegna diretta e immediata a uno stabilimento dotato di strutture ufficialmente approvate per l'eliminazione dei rifiuti che escludano qualsiasi rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo e provvisto di dispositivi per la pulizia e la disinfezione almeno dei veicoli in uscita,

   o

   — altri interventi, sempreché sia stato accertato che non esiste alcun rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo; tali interventi, debitamente motivati, vengono notificati alla Commissione e agli altri Stati membri.

   Qualsiasi materiale di rifiuto associato alle alternative sopra descritte e da esse prodotto verrà eliminato secondo metodi ufficialmente approvati a norma di quanto disposto nell'allegato VII della presente direttiva.

2. L'utilizzazione o l'eliminazione idonee del materiale vegetale elencato di cui all'articolo 6, paragrafo 2, da effettuarsi sotto il controllo degli organismi ufficiali competenti dello Stato o degli Stati membri interessati, prevedendo uno scambio di informazioni fra gli organismi ufficiali tale da assicurare la costanza di tale controllo, e l'approvazione da parte degli organismi ufficiali competenti degli Stati membri dove le patate sono imballate o trattate in relazione agli impianti destinati all'eliminazione dei rifiuti di cui al primo e secondo trattino, comprendono:

   i) per i tuberi di patata:

      — l'impiego come patate da consumo, in imballaggi pronti per la consegna diretta e l'utilizzo senza necessità di riconfezionamento, in uno stabilimento dotato degli idonei impianti di eliminazione dei rifiuti; le patate destinate alla piantagione possono essere manipolate presso lo stesso stabilimento solo se tale operazione avviene separatamente dalla manipolazione delle patate da consumo o previa pulizia e disinfezione,

      o

      — l'impiego come patate da consumo destinate alla trasformazione industriale e consegnate direttamente e immediatamente ad uno stabilimento dotato di strutture apposite per l'eliminazione dei rifiuti e di un dispositivo per la pulizia e la disinfezione almeno dei veicoli in uscita,

      o

      — altri impieghi o forme di eliminazione, sempre che sia accertato che non esiste alcun rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo, e fatta salva l'approvazione degli organismi ufficiali competenti di cui sopra;

   ii) per altre parti di piante, compresi gli steli e i cascami del fogliame:

      — la distruzione,

      o

      — altri impieghi o forme di eliminazione, sempre che sia accertato che non esiste alcun rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo, e fatta salva l'approvazione degli organismi ufficiali competenti di cui sopra.

3. I metodi adeguati per la decontaminazione degli oggetti di cui all'articolo 6, paragrafo 3, consistono nella pulizia e all'occorrenza nella disinfezione, in modo da escludere qualsiasi rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo, e sono applicati sotto la sorveglianza degli organismi ufficiali responsabili degli Stati membri.

4. La serie di interventi che gli Stati membri attuano nella zona o nelle zone delimitate ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto iv), e lettera c), punto iii), e di cui all'articolo 6, paragrafo 4, comprende quanto segue:

4.1. Nei casi in cui i luoghi di produzione sono stati dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii):

a) in un appezzamento o un'unità di produzione protetta della coltura dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii),

i) per almeno i quattro anni vegetativi successivi a quello in cui la contaminazione è stata dichiarata:

— si attuano interventi intesi ad eliminare le piante di patate o di pomodoro spontanee e altre piante ospiti dell'organismo nocivo, comprese le solanacee selvatiche,

e

— è vietato mettere a dimora:

— tuberi, piante o semi propriamente detti di patata,

— piante o semi di pomodoro,

— tenendo conto della biologia dell'organismo nocivo:

— altre piante ospiti,

— piante della specie Brassica per le quali sussiste un rischio effettivo di sopravvivenza di detto organismo,

— colture per le quali sussiste un rischio effettivo di disseminazione dell'organismo nocivo;

nel primo periodo di raccolta delle patate o dei pomodori che segue il periodo indicato al trattino precedente, e a condizione che il terreno sia risultato esente da piante spontanee di patata e di pomodoro e da altre piante ospiti, comprese le solanacee selvatiche, nel corso di ispezioni ufficiali per almeno due anni vegetativi consecutivi precedenti alla messa a dimora:

— nel caso delle patate, è autorizzata soltanto la produzione di patate da consumo,

— nel caso delle patate e dei pomodori, i tuberi delle patate dopo il raccolto o le piante di pomodoro, secondo il caso, sono controllati secondo la procedura descritta nell'allegato II;

— nel periodo di raccolta delle patate o dei pomodori che segue quello indicato al trattino precedente e applicando un ciclo di rotazione idoneo, della durata di almeno due anni laddove si tratti di mettere a dimora patate da semina, viene effettuato un accertamento ufficiale come indicato all'articolo 2, paragrafo 1;

oppure

ii) nei cinque anni vegetativi successivi a quello in cui la contaminazione è stata dichiarata:

— si attuano interventi intesi ad eliminare le piante di patata o di pomodoro spontanee e altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo, comprese le solanacee selvatiche,

e

— per i primi tre anni l'appezzamento viene messo e tenuto a maggese completo, oppure a cereali conformemente al rischio identificato, oppure a pascolo permanente e si effettuano frequenti falciature a raso, oppure l'appezzamento viene adibito a pascolo intensivo, oppure ad erba per la produzione di sementi, e nei due anni successivi viene piantato con piante che non ospitano l'organismo nocivo e non comportano rischio identificato di sopravvivenza o disseminazione dell'organismo nocivo,

— nel primo periodo di raccolta delle patate o dei pomodori che segue quello indicato al trattino precedente, e a condizione che il terreno sia risultato esente da piante spontanee di patata e di pomodoro e da altre piante ospiti, comprese le solanacee selvatiche, nel corso di ispezioni ufficiali per almeno due anni vegetativi consecutivi precedenti alla messa a dimora:

— nel caso delle patate, è autorizzata la produzione di patate da semina o da consumo,

— i tuberi delle patate dopo il raccolto o le piante di pomodoro, secondo i casi, sono controllati conformemente alla procedura descritta nell'allegato II;

b) in tutti gli altri appezzamenti del luogo di produzione contaminato e a condizione che gli organismi ufficiali competenti abbiano la ragionevole certezza che il rischio di piante spontanee di patate e di pomodoro e di altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo, comprese le solanacee selvatiche, sia stato eliminato:

— nell'anno vegetativo successivo a quello in cui la contaminazione è stata dichiarata,

— è vietato mettere a dimora tuberi, piante o semi propriamente detti di patata o altre piante ospiti dell'organismo nocivo,

o

— nel caso dei tuberi di patata, vengono messi a dimora unicamente tuberi-seme certificati per la produzione di patate da consumo,

— nel caso delle piante di pomodoro, possono venir messe a dimora piante di pomodoro rispondenti alle prescrizioni della direttiva 2000/29/CE unicamente per la produzione di frutti;

— nel secondo anno vegetativo successivo a quello in cui la contaminazione è stata dichiarata,

— nel caso delle patate, vengono messi a dimora per la produzione di patate da semina o da consumo esclusivamente i tuberi-seme certificati o i tuberi-seme di patate ufficialmente sottoposti a un esame volto ad accertare l'assenza di marciume bruno e coltivati sotto controllo ufficiale in luoghi di produzione diversi da quelli indicati al punto 4.1,

— nel caso dei pomodori, possono venir messe a dimora per la produzione di piante o di frutti esclusivamente le piante di pomodoro cresciute da semi che rispondono alle prescrizioni della direttiva 2000/29/CE ovvero, nel caso di piante ottenute per riproduzione vegetativa, da piante di pomodoro prodotte a partire da tali semi e coltivate sotto controllo ufficiale in luoghi di produzione diversi da quelli indicati al punto 4.1;

— per almeno il terzo anno vegetativo successivo a quello in cui la contaminazione è stata dichiarata,

— nel caso delle patate, per la produzione di patate da semina o da consumo vengono messi a dimora esclusivamente tuberi-seme certificati ovvero tuberi-seme di patate coltivati sotto sorveglianza ufficiale e derivanti da tuberi-seme certificati,

— nel caso dei pomodori, possono venir messe a dimora per la produzione di piante o di frutti esclusivamente le piante di pomodoro cresciute da semi che rispondono alle prescrizioni della direttiva 2000/29/CE ovvero piante di pomodoro prodotte a partire da tali piante e coltivate sotto controllo ufficiale;

— in ciascuno degli anni vegetativi di cui ai trattini precedenti si prendono provvedimenti per eliminare le piante spontanee di patata e le altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo eventualmente presenti; viene inoltre effettuata un'ispezione ufficiale in ogni appezzamento di patate o pomodori durante la stagione di crescita a momenti appropriati nonché, per per ogni appezzamento di patate, un controllo ufficiale dei tuberi raccolti secondo la procedura descritta nell'allegato II;

c) non appena avvenuta la dichiarazione di contaminazione ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), e dopo il primo anno vegetativo successivo:

— tutti i macchinari e le strutture di magazzinaggio presenti sul luogo di produzione e associati al ciclo produttivo delle patate o dei pomodori sono opportunamente puliti e all'occorrenza disinfettati con metodi adeguati, conformemente al punto 3,

per prevenire la disseminazione dell'organismo nocivo, sono effettuati controlli ufficiali sui programmi di irrigazione ed irrorazione, che possono arrivare al divieto;

d) nelle unità di produzione protetta dichiarate contaminate ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii), dove è possibile la sostituzione completa del substrato colturale:

— è vietato mettere a dimora tuberi-seme, piante o semi propriamente detti di patata, ovvero altre piante ospiti dell'organismo nocivo comprese le piante e i semi di pomodoro, a meno che l'unità sia stata sottoposta sotto controllo ufficiale a provvedimenti diretti ad eliminare l'organismo nocivo ed a rimuovere tutto il materiale vegetale ospite elencato e comprendenti almeno la sostituzione completa del substrato colturale nonché la pulizia, e all'occorrenza la disinfezione dell'unità di produzione e di tutte le attrezzature, e purché gli organismi ufficiali competenti abbiano successivamente autorizzato la produzione di patate o pomodori,

— la produzione di patate si effettua a partire da tuberi-seme certificati, o da minituberi o piantine ottenute da fonti controllate,

— la produzione di pomodori si effettua a partire da semi che rispondono alle prescrizioni della direttiva 2000/29/CE ovvero, nel caso di piante ottenute per riproduzione vegetativa, da piante di pomodoro prodotte a partire da tali semi e coltivate sotto controllo ufficiale,

— per prevenire la disseminazione dell'organismo nocivo vengono attuati secondo necessità controlli ufficiali sui programmi di irrigazione ed irrorazione, che possono arrivare al divieto.

4.2. All'interno della zona delimitata, fatti salvi gli interventi previsti al punto 4.1, gli Stati membri:

a) non appena è avvenuta la dichiarazione di contaminazione, garantiscono che tutti i macchinari e le strutture di magazzinaggio presenti nelle imprese della zona e impiegati nella produzione di patate o pomodori siano opportunamente puliti e disinfettati con metodi appropriati conformemente al punto 3;

b) non appena avvenuta la dichiarazione di contaminazione e per almeno tre periodi vegetativi:

ba) nei casi in cui la zona delimitata è stata determinata ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto iv):

— garantiscono il controllo, attraverso i propri organismi ufficiali responsabili, delle imprese in cui viene effettuata la coltivazione, il magazzinaggio o la manipolazione dei tuberi di patata o dei pomodori, nonché delle imprese che gestiscono su base contrattuale i macchinari occorrenti,

— esigono l'impiego esclusivo di semi certificati o semi coltivati sotto controllo ufficiale per tutte le colture di patata comprese in tale zona, e l'esecuzione di analisi dopo il raccolto di tuberi-seme di patate coltivati in luoghi di produzione dichiarati probabilmente contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto iii),

— prescrivono che la manipolazione delle patate da semina raccolte sia separata da quella delle patate da consumo in tutte le imprese della zona oppure che la pulizia e all'occorrenza la disinfezione siano effettuate tra la manipolazione delle patate da semina e quella delle patate da consumo,

— per tutti i raccolti di pomodoro effettuati in tale zona esigono l'impiego esclusivo di piante di pomodoro cresciute da semi che rispondono alle prescrizioni della direttiva 2000/29/CE ovvero, nel caso di piante ottenute per riproduzione vegetativa, da piante di pomodoro prodotte a partire da tali semi e coltivate sotto controllo ufficiale,

— eseguono gli accertamenti ufficiali di cui all'articolo 2, paragrafo 1;

bb) nei casi in cui le acque superficiali sono state dichiarate contaminate ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera c), punto ii), ovvero incluse fra i fattori di una possibile disseminazione dell'organismo nocivo conformemente all'allegato V, punto 2:

procedono in momenti appropriati ad accertamenti annuali comprendenti il prelievo di campioni di acque superficiali e delle eventuali piante solanacee ospiti nelle sorgenti d'acqua in esame, nonché ad analisi eseguite in conformità del metodo appropriato di cui all'allegato II per il materiale vegetale elencato e in tutti gli altri casi,

— per prevenire la disseminazione dell'organismo nocivo, attuano controlli sui programmi di irrigazione ed irrorazione, che possono arrivare al divieto d'impiegare l'acqua dichiarata contaminata per l'irrigazione e l'irrorazione del materiale vegetale elencato, nonché all'occorrenza di altre piante ospiti; questo divieto può essere riveduto sulla base dei risultati dell'accertamento annuale di cui sopra e le dichiarazioni di contaminazione possono essere revocate a condizione che gli organismi ufficiali competenti ritengano che le acque superficiali non siano più contaminate. L'impiego dell'acqua soggetta a divieto può essere autorizzato, sotto controllo ufficiale, per l'irrigazione e l'irrorazione delle piante ospiti qualora vengano impiegate tecniche ufficialmente approvate che eliminano l'organismo e ne impediscono la propagazione,

nei casi in cui gli scarichi di reflui sono contaminati, effettuano controlli ufficiali sull'eliminazione dei rifiuti o degli scarichi di reflui derivanti da stabilimenti industriali di trasformazione o imballaggio che manipolano il materiale vegetale elencato;

c) stabiliscono all'occorrenza un programma volto a sostituire tutte le scorte di tuberi-seme in un lasso di tempo adeguato.

ALLEGATO VII

I metodi ufficialmente approvati di eliminazione dei rifiuti di cui all'allegato VI, paragrafo 1, si uniformano alle disposizioni seguenti in modo da escludere qualsiasi rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo:

i) i rifiuti di patate e pomodori (inclusi le bucce di patata come pure patate e pomodori scartati) nonché ogni altro rifiuto solido associato a patate e pomodori (inclusi terreno, pietre ed altri detriti) verranno eliminati avvalendosi di una delle seguenti alternative:

— smaltimento in un sito apposito, ufficialmente approvato e destinato a tale scopo, in cui non siano identificabili rischi di dispersione dell'organismo nell'ambiente, ad esempio in seguito ad infiltrazione del terreno agricolo o contatti con sorgenti d'acqua che potrebbero essere usate per l'irrigazione di terreni agricoli. Il trasporto dei rifiuti in tale sito va effettuato servendosi di contenitori idonei ad eliminare ogni rischio di perdita dei rifiuti stessi,

— incenerimento,

— altri interventi, sempreché sia stato accertato che non esiste alcun rischio effettivo di disseminazione dell'organismo nocivo; tali interventi vengono notificati alla Commissione e agli altri Stati membri;

ii) rifiuti liquidi: prima dell'eliminazione i rifiuti liquidi che contengano materiale solido in sospensione vanno sottoposti a procedimenti di filtraggio o decantazione per rimuovere il materiale solido in questione, per la cui eliminazione si applicano le disposizioni di cui al precedente sottoparagrafo i).

Fatto questo, i rifiuti liquidi vengono:

— riscaldati fino ad una temperatura uniforme minima di 60 °C per almeno 30 minuti e successivamente eliminati,

ovvero

— eliminati in altri modi ufficialmente approvati e soggetti a controlli ufficiali tali da garantire che non sussistano rischi identificabili che tali rifiuti possano entrare in contatto con il terreno agricolo o con sorgenti d'acqua che potrebbero essere usate per l'irrigazione di terreni agricoli. I relativi particolari vengono notificati alla Commissione e agli altri Stati membri.

Le alternative descritte nel presente allegato valgono parimenti per i rifiuti associati alla manipolazione, allo smaltimento ed alla lavorazione di lotti di prodotto contaminati.»

08A01097

AUGUSTA IANNINI, *direttore*

ALFONSO ANDRIANI, *redattore*
DELIA CHIARA, *vice redattore*

(G803032/1) Roma, 2008 - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato S.p.A. - S.

GAZZETTA UFFICIALE
DELLA REPUBBLICA ITALIANA

CANONI DI ABBONAMENTO ANNO 2008 (salvo conguaglio) (*)

GAZZETTA UFFICIALE - PARTE I (legislativa)

			CANONE DI ABBONAMENTO
Tipo A	Abbonamento ai fascicoli della serie generale, inclusi tutti i supplementi ordinari:		
	(di cui spese di spedizione € 257,04)	- annuale	€ **438,00**
	(di cui spese di spedizione € 128,52)	- semestrale	€ **239,00**
Tipo A1	Abbonamento ai fascicoli della serie generale, inclusi i soli supplementi ordinari contenenti i provvedimenti legislativi:		
	(di cui spese di spedizione € 132,57)	- annuale	€ **309,00**
	(di cui spese di spedizione € 66,28)	- semestrale	€ **167,00**
Tipo B	Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata agli atti dei giudizi davanti alla Corte Costituzionale:		
	(di cui spese di spedizione € 19,29)	- annuale	€ **68,00**
	(di cui spese di spedizione € 9,64)	- semestrale	€ **43,00**
Tipo C	Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata agli atti della CE:		
	(di cui spese di spedizione € 41,27)	- annuale	€ **168,00**
	(di cui spese di spedizione € 20,63)	- semestrale	€ **91,00**
Tipo D	Abbonamento ai fascicoli della serie destinata alle leggi e regolamenti regionali:		
	(di cui spese di spedizione € 15,31)	- annuale	€ **65,00**
	(di cui spese di spedizione € 7,65)	- semestrale	€ **40,00**
Tipo E	Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata ai concorsi indetti dallo Stato e dalle altre pubbliche amministrazioni:		
	(di cui spese di spedizione € 50,02)	- annuale	€ **167,00**
	(di cui spese di spedizione € 25,01)	- semestrale	€ **90,00**
Tipo F	Abbonamento ai fascicoli della serie generale, inclusi tutti i supplementi ordinari, ed ai fascicoli delle quattro serie speciali:		
	(di cui spese di spedizione € 383,93)	- annuale	€ **819,00**
	(di cui spese di spedizione € 191,46)	- semestrale	€ **431,00**
Tipo F1	Abbonamento ai fascicoli della serie generale inclusi i supplementi ordinari con i provvedimenti legislativi e ai fascicoli delle quattro serie speciali:		
	(di cui spese di spedizione € 264,45)	- annuale	€ **682,00**
	(di cui spese di spedizione € 132,22)	- semestrale	€ **357,00**

N.B.: L'abbonamento alla GURI tipo A, A1, F, F1 comprende gli indici mensili
Integrando con la somma di € 80,00 il versamento relativo al tipo di abbonamento alla *Gazzetta Ufficiale* - parte prima - prescelto, si riceverà anche l'**Indice Repertorio Annuale Cronologico per materie anno 2008.**

CONTO RIASSUNTIVO DEL TESORO

Abbonamento annuo (incluse spese di spedizione) € **56,00**

PREZZI DI VENDITA A FASCICOLI
(Oltre le spese di spedizione)

Prezzi di vendita:		
	serie generale	€ 1,00
	serie speciali (escluso concorsi), ogni 16 pagine o frazione	€ 1,00
	fascicolo serie speciale, *concorsi,* prezzo unico	€ 1,50
	supplementi (ordinari e straordinari), ogni 16 pagine o frazione	€ 1,00
	fascicolo Bollettino Estrazioni, ogni 16 pagine o frazione	€ 1,00
	fascicolo Conto Riassuntivo del Tesoro, prezzo unico	€ 6,00

I.V.A. 4% a carico dell'Editore

5ª SERIE SPECIALE - CONTRATTI ED APPALTI

(di cui spese di spedizione € 127,00)	- annuale	€ **295,00**
(di cui spese di spedizione € 73,00)	- semestrale	€ **162,00**

GAZZETTA UFFICIALE - PARTE II

(di cui spese di spedizione € 39,40)	- annuale	€ **85,00**
(di cui spese di spedizione € 20,60)	- semestrale	€ **53,00**

Prezzo di vendita di un fascicolo, ogni 16 pagine o frazione (oltre le spese di spedizione) € 1,00
I.V.A. 20% inclusa

RACCOLTA UFFICIALE DEGLI ATTI NORMATIVI

Abbonamento annuo		€ **190,00**
Abbonamento annuo per regioni, province e comuni - SCONTO 5%		€ **180,50**
Volume separato (oltre le spese di spedizione)	€ 18,00	

I.V.A. 4% a carico dell'Editore

Per l'estero i prezzi di vendita, in abbonamento ed a fascicoli separati, anche per le annate arretrate, compresi i fascicoli dei supplementi ordinari e straordinari, devono intendersi raddoppiati. Per il territorio nazionale i prezzi di vendita dei fascicoli separati, compresi i supplementi ordinari e straordinari, relativi ad anni precedenti, devono intendersi raddoppiati. Per intere annate è raddoppiato il prezzo dell'abbonamento in corso. Le spese di spedizione relative alle richieste di invio per corrispondenza di singoli fascicoli, vengono stabilite, di volta in volta, in base alle copie richieste.

N.B. - Gli abbonamenti annui decorrono dal 1° gennaio al 31 dicembre, i semestrali dal 1° gennaio al 30 giugno e dal 1° luglio al 31 dicembre.

RESTANO CONFERMATI GLI SCONTI IN USO APPLICATI AI SOLI COSTI DI ABBONAMENTO

ABBONAMENTI UFFICI STATALI
Resta confermata la riduzione del 52% applicata sul solo costo di abbonamento

* tariffe postali di cui al Decreto 13 novembre 2002 (G.U. n. 289/2002) e D.P.C.M. 27 novembre 2002 n. 294 (G.U. 1/2003) per soggetti iscritti al R.O.C.